



Avaliação de Atividade Biológicas de Extratos do Fungo *Laurobasidium lauri*

Lisete Fátima Abreu da Lima Silva

10/2022



Avaliação de Atividades Biológicas de Extratos do Fungo *Laurobasidium lauri*

Autor

Lisete Fátima Abreu da Lima Silva

Orientador

Prof. Doutora Cláudia Marta Libreiro de Pinho, Centro de Investigação em Saúde e Ambiente (CISA), Escola Superior de Saúde (ESS) do Politécnico do Porto (IPP)

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de **Mestre em Farmácia – Ramo em Tecnologia do Medicamento e de Produtos de Saúde** pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

Agradecimentos

Nos momentos de maior desmotivação, foi o gosto pela fitoterapia e a tentativa de manter sempre presente o princípio do Prof. Dr. Francisco Matos de que *"nunca se deve subestimar a informação sobre plantas medicinais oriunda da sabedoria popular e somente repassá-la como verdadeira para o povo, depois de confirmar se a atividade atribuída realmente existe e que o seu uso como medicamento é seguro"*, que me deu forças para continuar e terminar este trabalho de investigação.

Antes de mais, queria deixar o meu muito obrigada à minha orientadora, a Prof. Doutora Cláudia Pinho, pela confiança e inestimável ajuda, orientação e experiência transmitida, mas sobretudo pela motivação e disponibilidade nesta última fase.

À equipa do CISA por toda a ajuda, principalmente na parte laboratorial, em especial à Bárbara e à Dona Elisabete pela disponibilidade e à Prof. Doutora Ana Isabel Oliveira por toda a ajuda no esclarecimento de dúvidas.

Um agradecimento especial ao meu marido, pelo incentivo, por ter sempre acreditado em mim e acompanhado em todos os momentos e por nunca me ter deixado desistir.

A todos os que não mencionei, mas que contribuíram de alguma maneira para a realização deste projeto, o meu sincero obrigada!

Resumo

Desde os primórdios da humanidade que se utilizam plantas/cogumelos medicinais. Porém, a falta de estudos acerca dos mesmos, aliados à urgência em descobrir novos fármacos, leva-nos a redescobrir os produtos naturais. O trabalho tem como objetivo avaliar diferentes atividades biológicas do *Laurobasidium lauri*, um fungo utilizado na medicina popular da ilha da Madeira, do qual pouco se sabe. Para tal, realizou-se um estudo experimental com extratos (aquoso e etanólico 55% (V/V)) do fungo isolado e em mistura com plantas medicinais, tendo-se avaliado a atividade antioxidante, antibacteriana, anti-inflamatória e citotóxica, *in vitro*. O extrato etanólico do fungo isolado obteve maior teor de compostos fenólicos (268±17,3 mg GAE/g), melhor valor de concentração mínima inibitória (MIC), para *S. aureus* (MIC=0,078125 mg/mL) e maior potencial antioxidante no ensaio do 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (IC₅₀= 18,9±2,2 µg/mL). O extrato etanólico do fungo em mistura apresentou maior ação quelante do ferro (IC₅₀=163,7±3,1 µg/mL) e maior ação citotóxica em células cancerígenas de pulmão (IC₅₀ de 48,3±1,0 µg/mL). O ensaio anti-inflamatório apenas demonstrou resultados em extratos de fungo isolado, tendo sido o único que apresentou maior atividade nos extratos aquosos (68,9% - 500 µg/mL). O fungo apresenta grande potencial, sendo necessários mais ensaios que confirmem estas atividades biológicas.

Palavras-chave: fungo, *Laurobasidium lauri*, atividade antioxidante, atividade antibacteriana, atividade citotóxica, atividade anti-inflamatória

Abstract

Since the beginning, humanity uses medicinal plants/mushrooms. However, the absence of studies, combined with the urgency in new drugs discoveries, leads us to rediscover natural products. The objective of this work is to evaluate different biological activities of *Laurobasidium lauri*, a fungus used in folk medicine on Madeira Island, which is not well known. An experimental study was carried out with extracts (aqueous and ethanolic 55% (V/V)) of the fungus isolated and mixed with medicinal plants, evaluating the antioxidant, antibacterial, anti-inflammatory, and cytotoxic activity, *in vitro*. The ethanolic extract of the isolated fungus had the highest content of phenolic compounds (2.68 ± 17.3 mg GAE/g), the best value of minimum inhibitory concentration (MIC) for *S. aureus* (MIC = 0.078125 mg/mL) and higher antioxidant potential in the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay ($IC_{50} = 18.9 \pm 2.2$ μ g/mL). The ethanolic extract of the fungus in mixture showed greater iron chelating action ($IC_{50} = 163.7 \pm 3.1$ μ g/mL) and greater cytotoxic action on lung cancer cells (IC_{50} of 48.3 ± 1.0 μ g/mL). The anti-inflammatory assay only showed results in isolated fungus extracts, being the only one that showed greater activity in aqueous extracts (68.9% - 500 μ g/mL). The fungus has great potential, but more tests are needed to confirm these biological activities.

Keywords: fungus, *Laurobasidium lauri*, antioxidant activity, antibacterial activity, cytotoxic activity, anti-inflammatory activity

Índice

Agradecimentos.....	II
Resumo.....	III
Abstract.....	IV
Lista de Abreviaturas.....	VII
Índice de Tabelas.....	IX
Índice de Figuras.....	X
1. Introdução.....	1
1.1. Papel do Stress Oxidativo e da Inflamação.....	3
1.1.1. Agentes Antioxidantes.....	6
1.2. Estirpes bacterianas resistentes aos antibióticos.....	7
1.3. Arquipélago da Madeira: A floresta laurissilva e a sua biodiversidade.....	9
1.3.1. A floresta de loureiros.....	9
1.3.1.1 <i>Laurus nobilis</i>	10
1.3.1.2 <i>Laurus azorica</i>	13
1.3.1.3 <i>Laurus novocanariensis</i>	13
1.3.2. Plantas utilizadas na medicina tradicional madeirense.....	14
1.3.2.1 Alfavaca (<i>P. judaica</i> L.).....	15
1.3.2.2 Sempre-noiva (<i>P. aviculare</i> L.).....	16
1.3.2.3 Canela-branca (<i>P. galioides</i> Kunth).....	17
1.3.3. <i>Laurobasidium lauri</i>	20
1.3.3.1 Utilizações tradicionais.....	20
1.3.3.2 Composição química.....	21
1.3.3.2.1 Reticulina.....	21
1.3.3.2.2 Lactonas sesquiterpénicas.....	22
1.4. Objetivos.....	23
2. Métodos.....	24
2.1. Reagentes.....	24
2.2. Recolha e preparação dos extratos.....	24
2.3. Ensaio relacionados com a atividade antioxidante.....	25

2.3.1. Determinação do teor dos compostos fenólicos totais	25
2.3.2. Ensaio do DPPH.....	25
2.3.3. Determinação da capacidade quelante do ferro (Fe ²⁺)	26
2.4. Ensaio de inibição da lipoxigenase (5-LOX)	26
2.5. Testes de suscetibilidade antibacteriana	27
2.5.1. Estirpes bacterianas e condições de cultura	27
2.5.2. Determinação da atividade antibacteriana	27
2.5.3. Ensaio de difusão em disco.....	27
2.5.4. Ensaio da microdiluição.....	27
2.5.5. Ensaio da resazurina.....	28
2.6. Ensaio de citotoxicidade	28
2.6.1. Linhas celulares e condições de cultura.....	28
2.6.2. Ensaio do MTT.....	29
2.7. Análise estatística.....	29
3. Resultados.....	30
3.1. Avaliação do potencial antioxidante	30
3.2. Avaliação da atividade anti-inflamatória.....	31
3.3. Avaliação da atividade antibacteriana	32
3.4. Avaliação da citotoxicidade.....	33
4. Discussão.....	36
4.1. Atividade antioxidante dos extratos de <i>L. lauri</i>	36
4.2. Atividade anti-inflamatória dos extratos de <i>L. lauri</i>	38
4.3. Atividade antibacteriana dos extratos de <i>L. lauri</i>	41
4.4. Atividade Citotóxica.....	43
5. Conclusão.....	46
6. Referências Bibliográficas	48
7. Anexos.....	76

Lista de Abreviaturas, Siglas e Acrónimos

α -MGBL	α -metileno- γ -butirolactona
μ g	Micrograma
μ L	Microlitros
μ M	Micromolar
5-LOX	5- lipoxigenase
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CAT	Catalase
CFU	Unidade formadora de colónias
CLSI	<i>Clinical & Laboratory Standards</i>
Cm ²	Centímetros quadrados
CO ₂	Dióxido de carbono
COX	Cicloxigenase
Cu	Cobre
DP	Desvio padrão
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
DMSO	Dimetilsulfóxido
EC ₅₀	Concentração que induz metade do efeito máximo
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
Fe	Ferro
Fe ²⁺	lão Ferroso
FRAP	<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>
g	Gramas
GAE	Equivalentes de ácido gálico
GLOBOCAN	Global Cancer Observatory
GNPS	<i>Global Natural Products Social Molecular Networking</i>
GPx	Glutaciona peroxidase
GSH	Glutaciona
GST	Glutaciona-S-transferase
h	Horas
HO-1	Heme-oxigenase-1

H₂O₂	Peróxido de hidrogénio
L	Litros
L•	Radicais lipídicos
LOO⁻	Radical peroxil lipídico
LOOH	Hidroperóxido
LOX	Lipoxigenase
MHB	<i>Müller-Hinton broth</i>
MIC	Concentração mínima inibitória
mM	Milimolar
mL	Mililitros
Mg	Miligramas
mm	Milímetros
MT&C	Medicina tradicional e complementar
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazólio
NA	<i>Nutrient Agar</i>
NCI	<i>American National Cancer Institute</i>
NGDA	Ácido nordihidroguaiarético
NF-κB	Factor nuclear kappa B
nm	Nanometros
Nrf-2	Fator nuclear eritróide 2
NO	Óxido nítrico
¹O₂	Oxigénio singleto
O₂•⁻	Radical superóxido
OMS	Organização Mundial de Saúde
ONOO⁻	Radical peroxinitrito
PUFAs	Ácidos gordos polinsaturados
RNS	Espécies Reativas de Azoto
ROS	Espécies Reativas de Oxigénio
RSA	Atividade captadora de radicais livres
SARS	Síndrome Respiratório Agudo Severo
SOD	Superóxido dismutase
SPP	Espécies
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TPC	Teor de compostos fenólicos totais
V/V	Volume/volume

Índice de Tabelas

Tabela 1. Aplicações terapêuticas e atividades biológicas do <i>L. nobilis</i> descritas na literatura.....	12
Tabela 2. Usos tradicionais e atividades biológicas descritas na literatura para a <i>P. judaica</i>	18
Tabela 3. Usos tradicionais e atividades biológicas descritas na literatura para a <i>P. aviculare</i>	19
Tabela 4. Usos tradicionais e atividades biológicas descritas na literatura para a <i>P. galioides</i>	19
Tabela 5. Atividade <i>in vitro</i> dos extratos aquosos e etanólicos do fungo isolado e em mistura com plantas medicinais, assim como dos respectivos controlos positivos (quercetina e EDTA).....	30
Tabela 6. Teor de compostos fenólicos totais nos extratos aquoso e etanólico 55% (V/V) do <i>L. lauri</i> isolado e <i>L. lauri</i> em mistura.....	31
Tabela 7. Efeito do extrato aquoso de <i>L. lauri</i> isolado na inibição da LOX.....	31
Tabela 8. Efeito do extrato aquoso de <i>L. lauri</i> em mistura na inibição da LOX.....	31
Tabela 9. Efeito do extrato etanólico de <i>L. lauri</i> isolado na inibição da LOX.....	32
Tabela 10. Efeito do extrato etanólico de <i>L. lauri</i> em mistura na inibição da LOX.....	32
Tabela 11. Diâmetro da zona de inibição (mm \pm DP; n=3) do extrato aquoso de <i>L. lauri</i> e de <i>L. lauri</i> em mistura nas concentrações de 1 mg/mL, 5 mg/mL e 10 mg/mL e da Ciprofloxacina 5 μ g/disco, em placas inoculadas com <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	32
Tabela 12. Diâmetro da zona de inibição (mm \pm DP; n=3) do extrato etanólico de <i>L. lauri</i> e de <i>L. lauri</i> em mistura nas concentrações de 1 mg/mL, 5 mg/mL e 10 mg/mL e da Ciprofloxacina 5 μ g/disco, em placas inoculadas com <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	33
Tabela 13. Determinação da concentração mínima inibitória (MIC) (μ g/mL) dos extrato aquoso e etanólico 55% (V/V) de <i>L. lauri</i> isolado e de <i>L. lauri</i> em mistura sobre o <i>S. aureus</i>	33

Índice de Figuras

Figura 1. Principais dificuldades relatadas pelos Estados-Membros na regulamentação de terapêuticas não convencionais.....	2
Figura 2. Formação de radicais livres e a resposta antioxidante.....	4
Figura 3. Duas vias metabólicas do ácido araquidónico que produzem inflamação.....	6
Figura 4. Esquema dos principais mecanismos de resistência desenvolvido pelas bactérias.....	8
Figura 5. Imagem e distribuição em Portugal da espécie <i>Laurus nobilis</i>	11
Figura 6. Diferenças entre as folhas das diferentes espécies do género <i>Laurus</i> em Portugal: <i>L. nobilis</i> (1), <i>L. azorica</i> (2) e <i>L. novocanariensis</i> (3).....	14
Figura 7. <i>Parietaria judaica</i> (Alfavaca).....	16
Figura 8. <i>Polygonum aviculare</i> (Sempre-noiva).....	17
Figura 9. <i>Peperomia galioides</i> (Canela-Branca).....	18
Figura 10. <i>Laurobasidium lauri</i> (Madre-de-louro).....	20
Figura 11. Estrutura química da reticulina).....	22
Figura 12. Estrutura química da costunolida (1) e do dehidrocostus (2).	22
Figura 13. Citotoxicidade de diferentes concentrações do extrato aquoso de <i>L. lauri</i> isolado em células cancerígenas de pulmão (A549).	34
Figura 14. Citotoxicidade de diferentes concentrações do extrato aquoso de <i>L. lauri</i> em mistura em células cancerígenas de pulmão (A549).	34
Figura 15- Citotoxicidade de diferentes concentrações do extrato etanólico de <i>L. lauri</i> isolado em células cancerígenas de pulmão (A549).	35
Figura 16. Citotoxicidade de diferentes concentrações do extrato etanólico de <i>L. lauri</i> em mistura em células cancerígenas de pulmão (A549).	35

1. Introdução

Desde tempos ancestrais, que os seres humanos utilizam os vários recursos que a natureza oferece para o tratamento de inúmeras patologias. Várias civilizações foram importantes na utilização de produtos naturais, como a civilização egípcia (*Papiro de Ebers*), a civilização chinesa (*Pen Tsao*), a hindu (*Charaka Samhita*), a grega (*Historia Plantarum* e *De Causis Plantarum*) e a romana (*De Materia Medica*) (da Cunha, 2017).

No século XIX, o primeiro composto, a morfina, é isolado por Friederich Sertürner a partir do ópio. Contudo, apenas no fim do século é que começou a existir um aumento do interesse acerca da composição química dos produtos naturais, interesse esse que levou ao desenvolvimento de várias técnicas. Foi já no século XX, que o estudo dos produtos naturais conduziu à descoberta de inúmeros compostos e estruturas químicas, sendo possível, a partir daí, a sua síntese em laboratório. Isto provocou um ligeiro declínio dos estudos na área da Fitoterapia, havendo preferência pelos fármacos de origem sintética. Porém, na década de 80, a utilização de plantas para fins medicinais voltou a ganhar destaque, registando-se, já no século XXI, um aumento dos estudos científicos nesta área (Macías et al., 2007; Miraldi & Baini, 2019).

Os produtos naturais continuam a ser utilizados, por parte da população mundial, principalmente em países em desenvolvimento, onde podem integrar os cuidados primários de saúde, ou, em alguns casos, constituem o único método de tratamento. Em alguns países desenvolvidos, apesar de existir um sistema de saúde implementado, o uso deste tipo de terapias advém de influências culturais ou como complemento/alternativa às terapêuticas convencionais. As principais razões apontadas para a utilização de terapêuticas não convencionais em países desenvolvidos são: a insatisfação com o serviço de saúde do país onde vivem; a falência/falta de opções convencionais; a prevenção de doenças e a procura de estilos de vida mais saudáveis. Muitos consumidores ainda assumem, erroneamente, que por se tratar de um produto natural, é seguro e desprovido de efeitos adversos/toxicidade. Como tal, a Organização Mundial de Saúde (OMS) tem vindo a promover estudos que identifiquem as dificuldades em regulamentar o uso das terapêuticas não convencionais, no sentido de desenvolver estratégias, que têm como intuito a sua utilização segura (Miraldi & Baini, 2019; WHO, 2020) (Figura 1).

As plantas e cogumelos medicinais, devido à sua composição rica em compostos fenólicos, terpenos, polissacarídeos, proteínas e vitaminas, possuem diversas atividades biológicas, nomeadamente, atividade antioxidante, imunomoduladora (Kozarski et al., 2011) antimicrobiana, antidiabética, anti-inflamatória (Friedman, 2016; Jucá et al., 2020), desempenhando um papel fundamental como principal meio para o desenvolvimento de novos fármacos.



Figura 1. Principais dificuldades relatadas pelos Estados-Membros na regulamentação de terapêuticas não convencionais (adaptado de World Health Organization, 2013)

O avanço de várias tecnologias, sejam elas de sequenciação do genoma ou da biologia computacional, assim como a não replicação de moléculas através de uma rede de *networking* (por exemplo, do *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS)) também aceleraram o processo de identificação e previsão de várias moléculas com novos alvos terapêuticos (Quinn et al., 2017).

Vários fármacos foram descobertos através do estudo de diferentes plantas e fungos, como é o caso do ácido acetilsalicílico, proveniente do salgueiro (*Salix alba*); da penicilina proveniente de um fungo (*Penicillium rubens*); ou do paclitaxel, proveniente do teixo do pacífico (*Taxus brevifolia*). Contudo, estima-se que das cerca de 350.000 espécies de plantas vasculares cientificamente estudadas, apenas 7% têm o seu uso medicinal documentado. E das cerca de 2,2 – 3,8 milhões de espécies de fungos conhecidos, grande parte continua por explorar (Hawksworth & Lücking, 2017; WCVP, 2020).

Uma dificuldade encontrada no estudo de plantas medicinais na descoberta de novos fármacos, é a preservação da espécie. Por exemplo, o paclitaxel, um fármaco citostático utilizado no tratamento do cancro da mama e dos ovários foi, inicialmente, extraído de uma espécie de teixo, o teixo do pacífico (*Taxus brevifolia*). Para tal, eram necessárias quatro árvores para obter cerca de 2 g de composto ativo (Griffon-Etienne et al., 1999). Isto provocou o declínio da população de várias espécies de teixo (*Taxus spp*). A descoberta de precursores do paclitaxel nas folhas e ramos do teixo europeu (*Taxus baccata*) levou a que fosse possível realizar a produção semi-sintética tanto do composto como dos seus análogos, o docetaxel e do cabazitaxel (Cragg & Pezzuto, 2016).

Os fungos, pelo contrário, causam pouco impacto nos ecossistemas, uma vez que, normalmente, é apenas necessária uma pequena porção do micélio. Além da dificuldade anteriormente descrita, a avaliação da eficácia dos produtos naturais demonstrou ser outra dificuldade a ultrapassar (Bernabeu et al., 2017; Howes et al., 2020). Em 2003, o surto de

Síndrome Respiratório Agudo Severo (SARS) na China foi tratado e contido com recurso ao uso de plantas utilizadas na Medicina Tradicional Chinesa. Porém, como os ensaios clínicos que comprovavam a eficácia destas plantas no tratamento da SARS apresentavam problemas metodológicos, os seus dados carecem de mais estudos (Leung, 2007; Liu et al., 2004). Como tal, as plantas e fungos medicinais devem ser devidamente estudados ao nível da sua composição química, farmacológica e do seu perfil de segurança, mas também devem ser alvo de estudos clínicos com o mesmo nível de rigor e exigência que os fármacos de origem sintética (Howes et al., 2020).

1.1. Papel do Stress Oxidativo e da Inflamação

O stress oxidativo tem sido alvo de diversos estudos, pois constitui um fator determinante para o aparecimento de doenças do sistema cardiovascular (Shokr et al., 2020; Singh et al., 2004), sistema endócrino (di Domenico et al., 2019; Newsholme et al., 2007) e sistema reprodutor (Zhang et al., 2021); doenças neurodegenerativas (Chaturvedi & Beal, 2013; Singh et al., 2019; Wang et al., 2019) e cancro (Galigniana et al., 2020; Samavarchi Tehrani et al., 2019; Singh et al., 2004; Sosa et al., 2013). O stress oxidativo surge quando há um desequilíbrio entre as espécies oxidantes e o sistema de defesa antioxidante, em favor do primeiro, levando a uma rutura da sinalização e do controlo do equilíbrio redox e/ou a danos moleculares num sistema biológico. Níveis elevados de espécies reativas de oxigénio (ROS) são considerados nocivos (Akki et al., 2021; Hussain et al., 2016; Singh et al., 2004).

Apesar de essencial em diversas funções do organismo, o oxigénio é também responsável pela formação de radicais livres e espécies não radicalares. Estes são produzidos em condições aeróbias, na membrana interna das mitocôndrias, como parte do metabolismo normal e possuem funções essenciais em diversas reações bioquímicas (como transdução de sinais, expressão de genes, ativação de recetores, reconhecimento de patógenos e garantir a viabilidade da célula, proliferação, migração e diferenciação) (Akki et al., 2021; Ali et al., 2020; Gulcin, 2020; Singh et al., 2019). Alguns ROS, como o superóxido ($O_2^{\bullet-}$), em células como os macrófagos e os neutrófilos são úteis no processo de fagocitose e consequente eliminação de bactérias. A questão é que os ROS não são seletivos, provocando danos não só nas bactérias como nas células circundantes, aumentando os processos inflamatórios (Elsayed Azab et al., 2019). Contudo, fatores externos como poluentes ambientais, tabaco, pesticidas, radiação e fármacos, podem exacerbar a produção de ROS, o que leva à oxidação de biomoléculas (proteínas, ADN e lípidos), produzindo metabolitos com efeitos citotóxicos e danos ao nível do ADN que se podem traduzir em mutações (Gulcin, 2020; Kamble & Gacche, 2019).

De uma maneira geral, todos os ROS são formados a partir do $O_2^{\bullet-}$ (Figura 2). A dismutação do radical ocorre de forma espontânea e leva à formação de peróxido de hidrogénio (H_2O_2). Esta reação também pode ser catalizada pela enzima superóxido dismutase (SOD). O H_2O_2 é considerado um ROS não radicalar de baixa reatividade. Contudo, níveis cronicamente elevados, representam citotoxicidade devido aos vários danos causados a diversos componentes celulares. Devido à sua semivida relativamente longa e à elevada permeabilidade às membranas celulares, o H_2O_2 consegue atingir células vizinhas. Por outro lado, o radical hidroxilo ($\bullet OH$), formado sobretudo a partir de reações entre $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 , é um forte oxidante, sendo considerado o ROS mais prejudicial devido à sua elevada reatividade (Powers et al., 2020). Outra via de formação de $\bullet OH$ é através da presença de metais de transição, como o ferro (Fe) e o cobre (Cu). Na reação de Fenton, por exemplo, o H_2O_2 reage com o ião Fe^{2+} . O $O_2^{\bullet-}$ também é responsável pela redução do Fe^{3+} em Fe^{2+} que leva à formação de $\bullet OH$. Estes metais estão também envolvidos na indução da peroxidação lipídica (Angelova et al., 2021; Harris & DeNicola, 2020; Newsholme et al., 2016).

Além das ROS, existe também a produção de espécies reativas de azoto (RNS). De notar que a presença de óxido nítrico (NO) reage com o $O_2^{\bullet-}$ em excesso, formando peroxinitrito ($ONOO^-$). Este radical é um forte agente oxidante e que afeta, irreversivelmente, a estrutura e função das proteínas celulares (stress nitrosativo) e promove a peroxidação lipídica (e formação de hidroperóxido (LOOH)), a formação de aldeídos, o mau funcionamento da mitocôndria e provoca stress no retículo endoplasmático. Isto leva a danos ao nível do ADN provocando apoptose e morte celular (Newsholme et al., 2016; Powers et al., 2020).

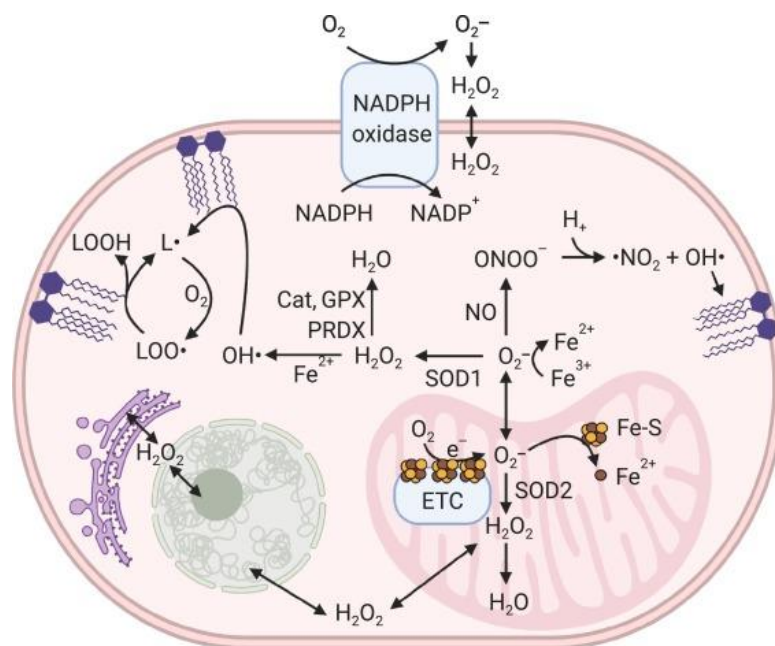


Figura 2. Formação de radicais livres e a resposta antioxidante (Harris & DeNicola, 2020).

O stress oxidativo pode ativar uma variedade de fatores de transcrição, que levam à expressão diferencial de alguns genes envolvidos nas vias inflamatórias. A inflamação ativada pelo stress oxidativo é a causa de muitas doenças crônicas, além de estar intimamente relacionado com a carcinogénese (Liguori et al., 2018; Ondua et al., 2019; Tasneem et al., 2019).

Os processos inflamatórios podem ativar a transcrição de fatores que induzem a proliferação e apoptose celular e a carcinogénese, assim como estão associados ao aumento da angiogénese cancerígena. Os ROS, por sua vez, podem produzir danos oxidando as bases nucleicas. A tentativa de reparação dos danos, pode levar a erros e resultar em mutagénese. Além disso, pode também provocar alterações ao nível das funções proteicas, no entanto, os seus efeitos estão relacionados com o nível de oxidação. Baixos níveis são normalmente reversíveis e promovem a sinalização celular. Pelo contrário, altos níveis de oxidação, podem levar à oxidação do terminal e perda completa da função da proteína. Contudo, a relação dos ROS na carcinogénese não é linear, pois são processos complexos e que estão condicionados a vários fatores, como a quantidade, a duração, localização e contexto (Harris & DeNicola, 2020). A inflamação pode também estar associada a um trauma, predisposição genética e à idade, que com o tempo pode provocar danos nas células do organismo, libertando vários componentes da membrana que ativam o processo inflamatório (George et al., 2014).

A peroxidação lipídica pode ocorrer através de duas vias: a via não específica, onde estão envolvidos os ROS e a via enzimática, através da cicloxigenase (COX) e a lipoxigenase (LOX). Os ácidos gordos polinsaturados (PUFAs) da membrana celular, como o ácido araquidónico, o ácido linoleico e o ácido decasohexaenóico, são os mais afetados (Angelova et al., 2021; Liguori et al., 2018).

Os PUFAs são mais suscetíveis à peroxidação lipídica devido às suas ligações duplas entre carbonos que possuem átomos de hidrogénio altamente reativos. A reação inicia-se na presença do radical $\bullet\text{OH}$, formando radicais lipídicos ($\text{L}\bullet$) e radicais peroxil lipídico ($\text{LOO}\bullet$) e o LOOH , que voltam a reagir com os PUFAs, perpetuando as reações de peroxidação lipídica (Harris & DeNicola, 2020).

O ácido araquidónico é importante em várias vias metabólicas, contudo, quando produzido em excesso, pode ser metabolizado por dois sistemas enzimáticos, a COX e a LOX, e convertido em substâncias com potencial inflamatório, nomeadamente prostaglandinas e leucotrienos (Figura 3). As prostaglandinas funcionam também como reguladores biológicos, ao contrário dos leucotrienos, que possuem apenas natureza patogénica (George et al., 2014; Hadjipavlou-Litina et al., 2007).

Nos últimos anos, a investigação tem-se focado na via da LOX, uma vez que o controlo dessa via tem um papel importante no alívio da dor articular. A COX-1 e a 5-LOX são enzimas-chave

envolvidas na formação de mediadores pró-inflamatórios como os eicosanóides, a partir do ácido araquidônico (Macedo et al., 2021; Nguyen et al., 2020).

Nos últimos anos, o uso de plantas para o tratamento das doenças inflamatórias tem ganho destaque (Bernstein et al., 2018; George et al., 2014). Devido ao risco cardiovascular e à toxicidade associada à pele, alguns inibidores da COX-2 foram retirados do mercado (Greenberg et al., 2009). Além disso, os inibidores da 5-LOX, de origem vegetal, parecem oferecer um alívio significativo e ausência de efeitos adversos, podendo vir a ser uma opção terapêutica preferível no futuro (Gilbert et al., 2020; Langhansova et al., 2017; Sengupta et al., 2008).

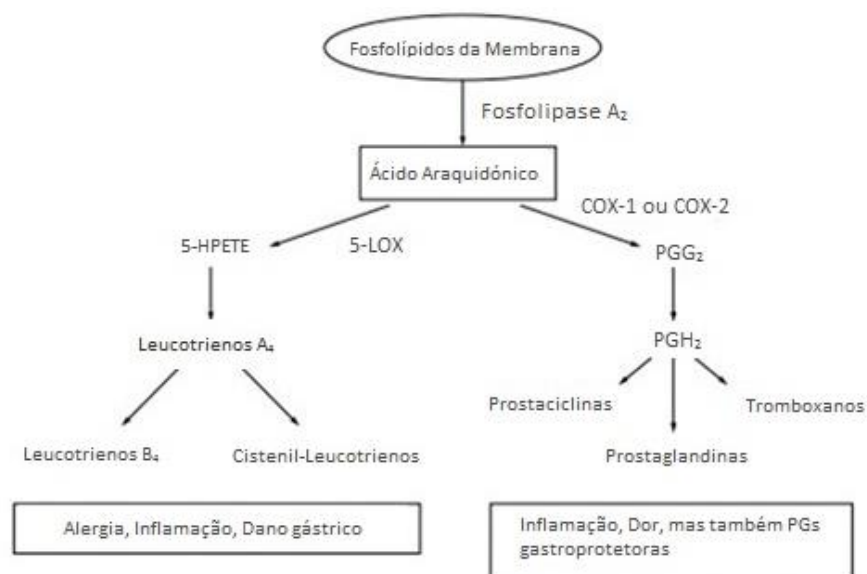


Figura 3. Duas vias metabólicas do ácido araquidônico que produzem inflamação (adaptado de Martel-Pelletier et al., 2003).

1.1.1. Agentes Antioxidantes

Os antioxidantes são essenciais para contrariar os efeitos nocivos do stress oxidativo. Um antioxidante é um composto que permite “prevenir, retardar, remover ou proteger uma dada molécula, contra o dano oxidativo” (Costantini, 2019; Gulcin, 2020). Existem vários mecanismos pelos quais os antioxidantes atuam: evitando a formação de ROS ou eliminando-as; reparando ou removendo os danos causados; desativando a cadeia oxidativa ou evitando a sua propagação; e agindo como quelantes de metais (Ali et al., 2020). Os antioxidantes classificam-se como enzimáticos ou não enzimáticos, podendo ser obtidos de forma endógena e exógena (Costantini, 2019; Gulcin, 2020; Olszowy, 2019).

Os antioxidantes enzimáticos são constituídos principalmente por três grupos: o SOD cuja principal função é, como descrito anteriormente, a captura do $O_2^{\bullet-}$ e conversão em H_2O_2 através de uma reação de dismutação; a catalase, que decompõe o H_2O_2 , reduzindo assim a sua acumulação nas células e protegendo-as de possíveis danos; e a glutatona peroxidase (GPx) que tem como

objetivo a redução de LOOH e outros peróxidos orgânicos, possuindo especial afinidade para a redução do H₂O₂. Dentro deste último grupo, inclui-se a glutationa-S-transferase (GST), que tal como a anterior, catalizam reações de decomposição de peróxidos lipídicos estando associadas à desintoxicação de xenobióticos e a glutationa redutase (GR), que tem como principal objetivo a manutenção dos níveis celulares de glutationa (GSH), um antioxidante não enzimático que atua na homeostase das células (Angelova et al., 2021; Azab et al., 2019; Harris & DeNicola, 2020).

Em relação aos não enzimáticos, incluem-se nesta classificação antioxidantes como a vitamina C útil na neutralização de radicais livres (ex: •OH e O₂•⁻), a vitamina E que desempenha um papel fundamental na proteção das membranas celulares, interferindo nas reações que levam à peroxidação lipídica, os carotenoides, em particular o β-caroteno, que exerce a sua proteção contra o oxigénio singleto (¹O₂), o ubiquinol, que auxilia na regeneração da vitamina E, e os compostos fenólicos, nomeadamente os polifenóis, que estão presentes nas plantas, e possuem um elevado poder antioxidante devido aos seus vários mecanismos de ação. Sugere-se que estes antioxidantes naturais possam reforçar a ação dos antioxidantes endógenos contra os ROS, exercendo efeito protetor sobre várias patologias (Azab et al., 2019; Liguori et al., 2018; Mannucci et al., 2021).

1.2. Estirpes bacterianas resistentes aos antibióticos

A resistência a antibióticos, está associada ao uso indiscriminado, à automedicação e à interrupção da terapêutica, assim como à falha no desenvolvimento/descoberta de novas moléculas com atividade antibacteriana (Aslam et al., 2018; Cappiello et al., 2020).

Entre os anos 40 e 60, considerada a Era de Ouro dos antibióticos, a descoberta de um grande número antibióticos revolucionou a história da medicina e salvou inúmeras vidas. Instalou-se, inclusive, a crença de que as doenças infecciosas seriam facilmente erradicadas. Contudo, o aparecimento de resistências aos antibióticos, que continuam a aumentar a um ritmo acelerado, não foi acompanhado pela descoberta de novas moléculas com atividade antimicrobiana, apresentando até um decréscimo (Aslam et al., 2018; da Cunha et al., 2019; Gorlenko et al., 2020).

As resistências desenvolvidas pelas bactérias podem ser classificadas como naturais ou adquiridas, consoante a sua exposição ou não a fatores externos. Outra classificação é, se as resistências ocorrem apenas ao nível celular ou ao nível comunitário. As principais resistências desenvolvidas pelas bactérias, encontram-se destacadas na (Figura 4) e correspondem à limitação da absorção do fármaco pela impermeabilização da membrana, recorrendo a diferentes mecanismos consoante o tipo de bactérias (Gram (-) que utilizam lipopolissacarídeos ou Gram (+) que aumentam a espessura da sua parede externa) e a alterações no número de bombas de efluxo que expulsam o fármaco do interior da célula. A existência de um grande número de bombas de

efluxo é característica de infecções de elevada resistência. Estes dois mecanismos são considerados resistências naturais que ocorrem a nível celular. Outro tipo de resistência consiste na modificação do alvo do antibiótico (por ex: da alteração da proteína de ligação da penicilina nas Gram (+)), e na inativação do antibiótico, com recurso a enzimas que inativam os antibióticos (a mais conhecida é a hidrolisação dos antibióticos β -lactâmicos pela β -lactamase). Representam resistências adquiridas que ocorrem a nível celular. Por último, a formação de biofilme na membrana externa, onde algumas comunidades bacterianas em situações de stress segregam uma matriz extracelular espessa e pegajosa constituída por ADN, fibras amiloides e polissacarídeos. A matriz, só por si pode agir como um escudo, dificultando a difusão do fármaco, e pensa-se que o ADN presente, devido à sua carga negativa, poderá funcionar como agente quelante de antibióticos catiónicos. Por fim, estes aglomerados possuem bactérias em diferentes fases de divisão celular, onde as que se encontram no núcleo, por se encontrarem em maior stress (maior privação de oxigénio e nutrientes) abrandam o seu metabolismo, entrando em estados de dormência, tornando-as altamente resistentes. A formação de biofilme é a um dos mecanismos responsáveis por infeções crónicas, nosocomiais e em implantes, e é uma resistência adquirida que ocorre a nível comunitário (Cappiello et al., 2020; Gorlenko et al., 2020; Penesyan et al., 2015).

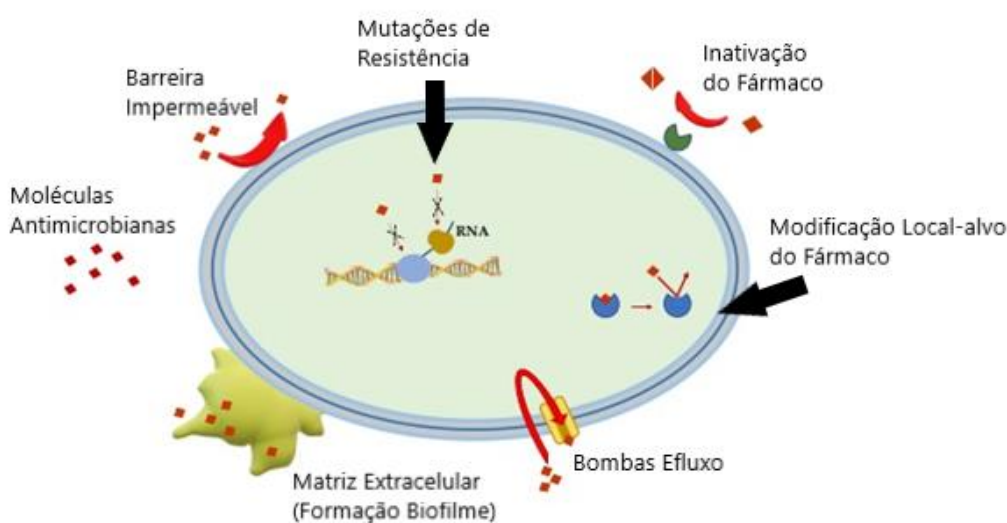


Figura 4. Esquema dos principais mecanismos de resistência desenvolvidos pelas bactérias (adaptado de Cappiello et al., 2020).

Várias organizações já reconheceram que o aumento de estirpes bacterianas resistentes aos antibióticos é um problema de saúde pública que pode tomar proporções alarmantes devido ao elevado custo, tanto económico como humano. No entanto, e mesmo tendo sido definidas várias diretrizes para resolver esta questão, as mesmas demonstraram ser insuficientes (Aslam et al.,

2018). Cerca de 20% das mortes a nível mundial devem-se a doenças infecciosas, algumas provocadas por infeções nosocomiais sem terapêutica eficiente e estima-se que, apenas na Europa, cerca de 700 mil casos de resistências a antibióticos levaram à morte de cerca de 33 mil indivíduos por ano. Prevê-se que, até 2050, o número de mortes devido a bactérias resistentes aos antibióticos poderá atingir os 300 milhões a nível mundial, e que nessa altura, no Reino Unido, o número de mortes irá rondar os 10 milhões por ano (Aslam et al., 2018; da Cunha et al., 2019; Review on Antimicrobial Resistance, 2014). Estudos indicam que o aumento do número de mortes devido às resistências aos antibióticos irá provocar, até 2050, custos que rondam os 1,2 triliões de dólares em cuidados de saúde e uma diminuição de 3,8% do produto interno bruto, o que se traduz numa diminuição de 6,1 triliões de dólares (Bank, 2017). Estas projeções poderão, contudo, encontrar-se enviesadas devido à pandemia COVID-19. Alguns dados disponíveis indicam que 72% de doentes com COVID-19 foram tratados com antimicrobianos, apesar de apenas 8% estar efetivamente infetado por bactérias ou fungos. A falta de tratamento eficaz contra o vírus levou à hipótese de uso de antibióticos (como a azitromicina e a ceftriaxona) o que levou ao seu uso indiscriminado (principalmente em países cuja venda de fármacos não é devidamente regulada). Junte-se a isso o uso generalizado de desinfetante, que exerce uma pressão extra na seleção natural de bactérias resistentes aos antibióticos (Ghosh et al., 2021; Ruiz, 2020). É por isso urgente o incentivo à pesquisa de novas moléculas, principalmente às que possuem atividade antimicrobiana, onde os compostos de produtos naturais, como plantas e cogumelos, constituem a principal fonte de recurso.

1.3. Arquipélago da Madeira: A floresta laurissilva e a sua biodiversidade

1.3.1. A floresta de loureiros

A família das Lauráceas contém cerca de 50 géneros de plantas e mais de 2000 espécies que se distribuem por zonas tropicais e subtropicais (Alejo-Armijo et al., 2017; Arroyo-García et al., 2001; Paparella et al., 2022; Sevindik & Okan, 2020). O género *Laurus*, por sua vez, é o único género nativo da Europa continental, marcando a sua presença em países com clima mediterrânico, como Itália, Grécia e na costa atlântica da Península Ibérica e França (Barla et al., 2007; Rodríguez-Sánchez & Arroyo, 2008). Também podemos encontrar espécies deste género em alguns países do Norte de África e nas ilhas da Macaronésia (zona que compreende os arquipélagos da Madeira, Açores, Canárias e nas zonas montanhosas de Cabo Verde) (Rivera & Obón, 1995; Rodríguez-Sánchez et al., 2009). É possível encontrar nestas ilhas uma floresta denominada de Laurissilva onde, além do género *Laurus*, também se encontram outros géneros da família *Lauraceae*, nomeadamente os géneros *Apollonia*, *Ocotea* e *Persea* (Betzin et al., 2016; Rodríguez-Sánchez et al., 2009). Supõe-se que esta vegetação represente um registo fóssil de

uma floresta subtropical que cobria a Europa no fim do período Terciário até à sua extinção no período Quaternário (Alessi et al., 2018; Kondraskov et al., 2015; Paparella et al., 2022; Regalado & Ritter, 2021).

As espécies do género *Laurus* são caracterizadas por árvores com folhas aromáticas, perenes, alongadas e brilhantes, com flores pequenas e o seu fruto é uma drupa carnuda de cor preta/azulada quando madura (Chahal et al., 2016; Nadeem et al., 2018; Nurdjannah & Bermawie, 2012). São intolerantes à geada constante e preferem regiões montanhosas, em altitudes que vão dos 600 aos 1200 metros, com clima quente e húmido, onde ocorre nevoeiro com muita frequência (Arroyo-García et al., 2001; da Cunha et al., 2009; Kondraskov et al., 2015).

Em Portugal estão descritas três espécies de loureiros, derivadas de um antepassado comum, que ocorrem em partes distintas do país: o *Laurus nobilis* L., que ocorre em Portugal continental, o *Laurus azorica* (Seub.) Franco, espécie presente no arquipélago dos Açores e o *Laurus novocanariensis* Rivas Mart., Lousã, Fern. Prieto, E. Dias, J. C. Costa et C. Aguiar, que habita as florestas no arquipélago da Madeira (Aboel-Atta, 2009; Arroyo-García et al., 2001; Furtado et al., 2014).

1.3.1.1 *Laurus nobilis*

Inicialmente descrita por Lineu como sendo uma planta nativa de Itália e Grécia, atualmente encontra-se cultivada um pouco por todo o Mediterrâneo (Figura 5). Distingue-se das outras espécies principalmente pelas suas características morfológicas. As suas folhas são verde-escuras e com formato elíptico-lanceoladas, o seu rebordo é ondulado e o tamanho varia entre 5 a 8 cm de comprimento e 3 a 4 cm de largura. As folhas jovens distinguem-se de outras espécies por serem glabras e o seu aroma mais cítrico, mais intenso (Arroyo-García et al., 2001; Chahal et al., 2016; Nadeem et al., 2018). Devido ao seu aroma característico são utilizadas como condimento um pouco por todo o mundo (Anzano et al., 2022; Kocabas et al., 2021; Nadeem et al., 2018). O seu óleo essencial pode ser extraído dos vários órgãos da planta, mantendo uma constituição química semelhante e variando apenas na quantidade dos compostos. As características químicas podem ainda variar consoante a distribuição geográfica (Bolarić et al., 2019).



Figura 5. Imagem e distribuição em Portugal da espécie *Laurus nobilis* (Jardim Botânico UTAD: *L. nobilis* L. (2022). UTAD. [https://jb.utad.pt/especie/Laurus_nobilis.](https://jb.utad.pt/especie/Laurus_nobilis))

As partes mais utilizadas são as folhas e os frutos. O óleo essencial dos frutos é o que apresenta maiores diferenças em termos qualitativos face aos restantes órgãos. Devido à sua elevada quantidade de ácidos gordos, é utilizada na indústria tanto na produção de sabão como em formulações cosméticas para fins específicos (Anzano et al., 2022; Chahal et al., 2016; Nadeem et al., 2018; Paparella et al., 2022). Além das suas aplicações na indústria e na culinária, o *L. nobilis* é a espécie mais estudada e com inúmeros artigos que exploram o seu uso na medicina tradicional. Julga-se que as atividades biológicas atribuídas ao *L. nobilis* são transversais a todas as espécies do género *Laurus* (Viveiros et al., 2022). O *L. nobilis* tem demonstrado atividade anti-inflamatória, analgésica (Lee et al., 2019), anticonvulsivante (Sayyah et al., 2003), assim como, atividade antioxidante (Conforti et al., 2006) e propriedades antimicrobianas (Ozcan et al., 2010). As folhas têm sido utilizadas para tratar dor reumática, artrite, inflamação da pele e asma (Lev & Amar, 2000; Loi et al., 2004). A tabela seguinte (Tabela 1) resume algumas as principais atividades estudadas até ao momento para a planta e extratos.

Tabela 1. Aplicações terapêuticas e atividades biológicas do *L. nobilis* descritas na literatura.

Aplicações Terapêuticas/ Atividades Biológicas	Referências
Antibacteriana	(Caputo et al., 2017; Chmit et al., 2014; Jamzad & Bidkorpheh, 2020; Kocabas et al., 2021; Nafis et al., 2020; Ramos et al., 2012; Riabov et al., 2020; Rizwana et al., 2019)
Antifúngica	(Caputo et al., 2017; de Corato et al., 2010; Fernandez-Andrade et al., 2016; Jamzad & Bidkorpheh, 2020; Nafis et al., 2020; Peixoto et al., 2017; Rizwana et al., 2019)
Antiviral	(Aurori et al., 2016)
Acaribicida	(Alimi et al., 2021; Macchioni et al., 2005, 2006a)
Nematicida	(Oka et al., 2000)
Antioxidante	(Basak & Candan, 2013; Brahmi et al., 2015; Brinza et al., 2021; Conforti et al., 2006; Duletić-Laušević et al., 2019; Ouchikh et al., 2011; Ramos et al., 2012)
Analgésica e Anti-inflamatória	(Juergens et al., 2003; Lee et al., 2019; Loi et al., 2005; Sayyah et al., 2003)
Citotóxica	(Al-Kalaldeh et al., 2010; El-Sawi et al., 2009);
Diaforética	(Fakir et al., 2009)
Repelente e Inseticida	(Chahal et al., 2016; Jemâa et al., 2012)
Antiepiléptica e Anticonvulsivante	(Sayyah et al., 2002)
Efeitos sedativos	(Everest & Ozturk, 2005; Passalacqua et al., 2007; Sayyah et al., 2003)
Antirreumática	(Ali-Shtayeh et al., 2000; Fakir et al., 2009; Menale et al., 2016; Passalacqua et al., 2007)
Distúrbios Gastrointestinais (anti-ulceroso, sintomas dispépticos, diarreia e obstipação)	(Fakir et al., 2009; Loi et al., 2004, 2005; Maxia et al., 2008; Menale et al., 2016; Passalacqua et al., 2007; Vitalini et al., 2015)
Doenças renais	(Ali-Shtayeh et al., 2000)
Doenças das vias respiratórias (tosse, gripe, constipações, asma, atividade mucolítica)	(Fortini et al., 2016; Juergens et al., 2003; Loi et al., 2004; Menale et al., 2016, 2022; Vitalini et al., 2015)
Doenças cardiovasculares	(Loi et al., 2004; Nadeem et al., 2018; Vitalini et al., 2015)
Diabetes	(Broadhurst et al., 2000) (Duletić-Laušević et al., 2019)
Enxaquecas	(Mattalia et al., 2020; Menale et al., 2016)
Dismenorreia	(Fortini et al., 2016; Maxia et al., 2008; Menale et al., 2016; Passalacqua et al., 2007)
Galactogogo	(Passalacqua et al., 2007)
Doença neurológicas do sistema nervoso central	(Chen et al., 2014; Duletić-Laušević et al., 2019)
Cicatrização de feridas	(Süntar et al., 2014)
Dermatite	(Ali-Shtayeh et al., 2000)

1.3.1.2 *Laurus azorica*

O *L. azorica* é a espécie endémica do arquipélago dos Açores e ocorre em todas as ilhas. Distingue-se do *L. nobilis* por possuir folhas suaves, pubescentes e suborbiculares e um aroma cítrico mais ligeiro (Aboel-Atta, 2009; Arroyo-García et al., 2001). Tal como o *L. nobilis* é utilizado na gastronomia regional. Na medicina tradicional está descrito o seu uso como desinfetante e o óleo essencial dos seus frutos é utilizado como cicatrizante de feridas (Viveiros et al., 2022).

1.3.1.3 *Laurus novocanariensis*

No arquipélago da Madeira, Canárias e em algumas zonas a sul de Marraquexe, vários autores consideram a existência de uma outra espécie dentro do género, o *L. novocanariensis* Rivas Mart., Lousã, Fern.Prieto, E.Días, J.C.Costa & C.Aguiar (considerada *L. azorica* até 2002) (Beierkuhnlein et al., 2021; Ferrari et al., 2005; Rivas-Martínez et al., 2001; Rodilla et al., 2008). Tendo esta espécie sido publicada, pela primeira vez em 2002, tem como sinónimo *L. azorica* var. *longifolia* (Kuntze) G.Kunkel.

Esta nova classificação taxonómica deve-se sobretudo a diferenças encontradas a nível morfológico e molecular. Esta nova classificação não é aceite por toda a comunidade científica, uma vez que, apesar das diferenças morfológicas, muitos consideram que em termos fitogenéticos as espécies não apresentam diferenças significativas que justifiquem uma nova classificação. Alguns sugerem até que as espécies insulares são uma sub-espécie do *L. nobilis* (Aboel-Atta, 2009; Alejo-Armijo et al., 2017; Arroyo-García et al., 2001).

Os estudos demonstram que tanto o *L. azorica* como o *L. novocanariensis* derivam do *L. nobilis* e apesar de existir uma maior relação entre as duas espécies insulares do que com a espécie continental, a sua evolução foi independente, tendo os estudos demonstrado que o *L. novocanariensis* teve uma evolução mais recente, possuindo maiores similaridades com o *L. nobilis* (Aboel-Atta, 2009). Neste trabalho vamos considerar a nova classificação taxonómica tendo em conta o número de artigos aqui referenciados que também a utilizam. Na figura seguinte (Figura 6) é possível visualizar as diferentes folhas das três espécies de *Laurus* referidas anteriormente.

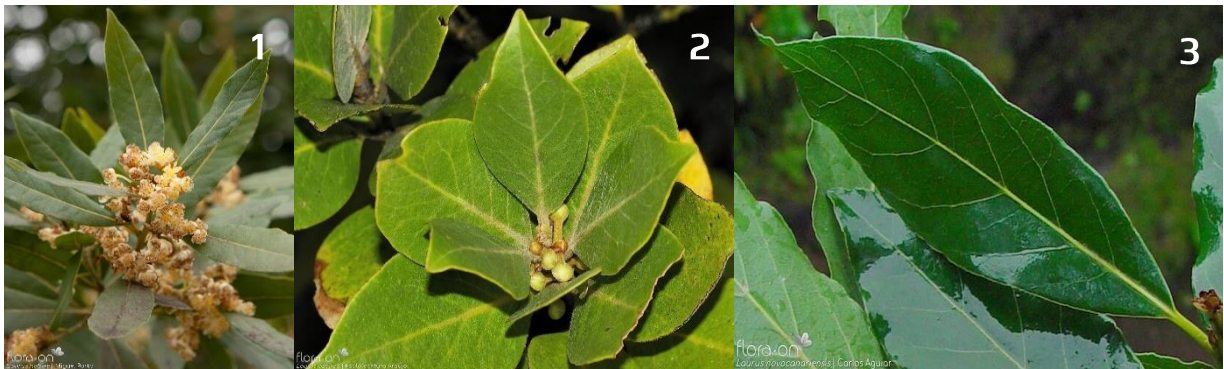


Figura 6. Diferenças entre as folhas das diferentes espécies do género *Laurus* em Portugal: *L. nobilis* (1), *L. azorica* (2) e *L. novocanariensis* (3) (Flora-On: Flora de Portugal Interactiva. (2014). Sociedade Portuguesa de Botânica. www.flora-on.pt).

As folhas do *L. novocanariensis* são verde-escuras e podem variar entre lanceoladas, elípticas, oblongas, ovadas ou suborbiculares. As folhas jovens são glabras na parte superior e tomentosas na parte inferior (Costa et al., 2004). A parte da planta utilizada varia consoante a sua utilização, desde as folhas e ramos, que são utilizadas na culinária devido aos seus compostos aromáticos, às suas bagas que, quando maduras, são utilizadas para a produção do “azeite de louro” cujo uso popular tem as mais variadas indicações (Rodilla et al., 2008). As utilizações populares descritas são similares ao *L. nobilis*. Externamente, é utilizado na cicatrização e desinfeção de feridas e como antirreumático (Luna-Herrera et al., 2007; Sequeira et al., 2006), tendo sido demonstrada a sua atividade acaricida (Macchioni et al., 2005, 2006). Internamente, é utilizado como depurativo sanguíneo, hemostático, nos distúrbios do sistema respiratório e do sistema digestivo (Luna-Herrera et al., 2007; Rodilla et al., 2008). Estudos de Tinoco et al., (2009) demonstraram efeitos gastroprotetores contra lesões gástricas provocadas pelo consumo de álcool, assim como a diminuição da concentração de álcool no sangue. Está também referenciada a sua utilização na prevenção de “males” (convulsões) e trombozes, assim como o seu uso nos primeiros estadios do cancro (Sequeira et al., 2006).

Tal como *L. nobilis*, pensa-se que a presença de monoterpenos e sesquiterpenos poderão ser responsáveis por grande parte das atividades biológicas descritas (Ferrari et al., 2005; Paparella et al., 2022; Viveiros et al., 2022).

1.3.2. Plantas utilizadas na medicina tradicional madeirense

O arquipélago da Madeira é conhecido pela sua floresta e a sua riqueza de plantas vasculares e briófitas (Llorent-Martínez et al., 2017). Dados de 2008, indicavam a presença de 1204 taxa (Jardim et al., 2008) de plantas vasculares no arquipélago da Madeira e das Selvagens. Em 2021, esse número foi atualizado com a adição de mais 72 taxa, atualizando o número anterior para 1276, sendo a sua maioria classificada como endémica do arquipélago da Madeira, endémica da Macaronésia ou como nativa da região (Jardim & de Sequeira, 2021).

Até à sua descoberta, a ilha estava coberta pela floresta, contudo foi prontamente desflorestada para dar início ao cultivo de cana-de-açúcar, empurrando a mancha florestal para altitudes entre os 300 e 1600 m de altitude (Claudino-Sales, 2019). A ilha da Madeira, ao contrário do arquipélago das Canárias, que era previamente habitado, apenas foi colonizada no século XV. A falta de conhecimento acerca das propriedades medicinais da flora endémica da ilha levou a que só a partir desta altura esse saber empírico começasse a ser adquirido (Rivera & Obón, 1995). A dificuldade de acesso a cuidados médicos até ao início do século XX levou a que os habitantes das ilhas utilizassem estes recursos naturais à sua disposição, nomeadamente as plantas e fungos circundantes, um saber que era normalmente atribuído às curandeiras. Com o passar do tempo e com a evolução e modernização da sociedade na ilha, esta sabedoria corre o risco de perder-se (Rivera & Obón, 1995). Atualmente, esse conhecimento pode ser encontrado entre a população mais idosa, nas zonas mais rurais e isoladas (Freitas & Mateus, 2013; Sequeira et al., 2006). É por isso importante a realização de estudos etnofarmacológicos que registem este saber popular, facilitando a seleção de plantas para estudos e eventualmente a descoberta de novos fármacos (Süntar, 2020). As recolhas de informações sobre o uso tradicional das plantas na ilha da Madeira foram realizadas por Rivera & Obón em 1995 e, posteriormente, realizadas em duas freguesias isoladas da região, freguesia da Ilha, concelho de Santana (Sequeira et al., 2006) e freguesia da Fajã da Ovelha, concelho da Calheta (Freitas & Mateus, 2013). Estas duas últimas permitiram-nos obter informações acerca das utilizações do fungo em estudo, seja ele isolado ou em associações com outras plantas. É possível também verificar que, consoante a zona geográfica, as formulações com outras plantas também diferem. Como tal, e tendo como referência o trabalho realizado por Sequeira et al., (2006), selecionamos a associação entre o *L. lauri* e a alfavaca (*Parietaria judaica* L.), a sempre noiva (*Polygonum aviculare* L.) e a canela-branca (*Peperomia galioides* Kunth), utilizada tradicionalmente em mulheres em período pós-parto.

1.3.2.1 Alfavaca (*P. judaica* L.)

Considerada uma erva daninha, a alfavaca, ou alfavaca-de-cobra, alfavaca-da-parede como é popularmente conhecida, é uma planta da família *Urticaceae*, perene, pubescente (sem pelos urticantes) e muito ramificada. As suas hastes são avermelhadas, mais ou menos eretas, podendo atingir até um metro de altura. O formato das suas folhas pode variar entre ovadas-acuminadas a lanceoladas com pelos nos veios e na superfície inferior. Cresce espontaneamente em zonas rochosas, como escarpas e na beira das estradas, assim como em áreas negligenciadas, como ruínas e muros de pedra (de Sousa et al., 2015; Jardim et al., 2008; Sequeira et al., 2006).



Figura 7. *Parietaria judaica* (Alfavaca) (Imagens de Flora-On: Flora de Portugal Interativa. (2014). Sociedade Portuguesa de Botânica. www.flora-on.pt.)

A *P. judaica* é uma planta com elevado potencial alergénico, devido à sua alta produção de pólen e responsável por induzir doença respiratória alérgica (de Sousa et al., 2015). É por isso que a maioria dos estudos que são realizados nesta espécie incidem nesta temática (Abel-Fernandez et al., 2012). Contudo, devido à existência de vários estudos etnofarmacológicos, é possível identificar as várias utilizações populares desta planta. Sabe-se, por exemplo, que a planta tem um elevado TPC (Khaledi et al., 2018; Tato et al., 2013) o que poderá explicar o efeito analgésico e anti-inflamatório que lhe é atribuído (Ambriz-Pérez et al., 2016). De realçar que a alfavaca também é utilizada com frequência em associação com outras plantas (Attard & Pacioni, 2011; Cornara et al., 2009; Fortini et al., 2016; Freitas & Mateus, 2013; Sequeira et al., 2006).

1.3.2.2 Sempre-noiva (*P. aviculare* L.)

Conhecida em Portugal por Sempre-noiva, a *P. aviculare* é uma herbácea anual, glabra e muito ramificada, podendo a sua postura variar entre ereta a decumbente. É uma planta comum em climas temperados, encontrando-se em Portugal no continente e no arquipélago da Madeira e habita zonas de baixa altitude, em bermas de caminhos, sebes, terrenos de cultivo e areias marítimas (da Cunha et al., 2009; Jardim et al., 2008; Sequeira et al., 2006). As suas folhas são lanceoladas, variando o seu tamanho conforme surgem nos ramos (mais pequenas) ou no caule principal (maiores) (Jardim et al., 2008; Sequeira et al., 2006) (Figura 8).



Figura 8. *Polygonum aviculare* (Sempre-noiva) (Imagens de: Freitas et al., 2013 (1) e Flora-On (2): Flora de Portugal Interativa. (2014). Sociedade Portuguesa de Botânica. www.flora-on.pt).

Existem vários artigos acerca desta espécie, tanto etnofarmacológicos como estudos de caracterização química e avaliação das suas atividades biológicas. Destacam-se os estudos acerca da sua atividade antioxidante (Gan et al., 2010; Hsu, 2006; Yang et al., 2015) e anti-inflamatória (Granica et al., 2013; Jeon et al., 2013; Park et al., 2018; Tunon et al., 1995).

1.3.2.3 Canela-branca (*P. galioides* Kunth)

Originária da América Central e do Sul, a canela-branca ou *Congona* (Neto et al., 2002) *Congona-blanca* (Wilches et al., 2021) ou *canelón* (Gradstein & Uribe, 2016) como é designada nos países onde ocorre de forma espontânea, é uma planta aromática, glabra e de caule reto. As suas folhas são carnudas com formato oblongo-elíptico e obtusas (Sequeira et al., 2006). Ao contrário das anteriores, a canela-branca não ocorre de forma espontânea na ilha da Madeira, sendo cultivada junto às habitações para fins medicinais (Freitas & Mateus, 2013; Sequeira et al., 2006) (Figura 9).

Existem vários estudos acerca da caracterização química desta espécie e da identificação dos constituintes químicos que lhe conferem atividade biológica. Villegas et al., (2001) atribuiu o efeito cicatrizante desta planta à presença de (+)-*epi*- α -bisabolol. Por sua vez, Mahiou et al., (1995, 1996) identificou a hidropiperona, o ácido grifólico, a grifolina e a peperogalina como os responsáveis pelo efeito antiparasitário. Em relação ao efeito antibacteriano (de Feo et al., 2008; Langfield et al., 2004; Neto et al., 2002) atribuído à espécie, Langfield et al., (2004) concluiu que os compostos responsáveis eram o ácido grifólico e a grifolina. A grifolina, por sua vez, tem demonstrado potencial anticancerígeno (Bouyahya et al., 2022) o que poderá, possivelmente, conferir esta atividade à *P. galioides*.

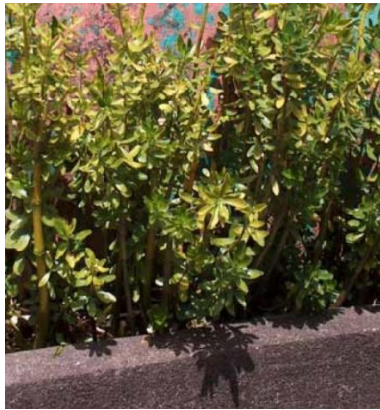


Figura 9. *Peperomia galioides* (Canela-Branca) (Freitas et al., 2013 e Sequeira et al., 2006)

As principais aplicações populares e atividades biológicas da *P. judaica*, *P. aviculare* e *P. galioides* estão descritas nas tabelas seguintes (Tabela 2, 3 e 4).

Tabela 2. Usos tradicionais e atividades biológicas descritas na literatura para a *P. judaica*.

Espécie	Usos Tradicionais/ Atividades Biológicas	Referências
<i>P. judaica</i>	Antibacteriana	(Abdallah & Omar, 2019; Khaledi et al., 2018; Qadi et al., 2020; Slaileh et al., 2013)
	Antifúngica	(Qadi et al., 2020)
	Analgésico e Anti-inflamatório	(Menale et al., 2022b)
	Inibição lipase	(Qadi et al., 2020)
	Inibição α -amílase	(Qadi et al., 2020)
	Citotóxica e Antiproliferativa	(Qadi et al., 2020)
	Distúrbios geniturinários: Dismenorreia; Cálculos renais.	(Cornara et al., 2009; Fortini et al., 2016; Freitas & Mateus, 2013)
	Uso veterinário: Antissético e anti-inflamatório no pós-parto em animais (vacas)	(Bonet & Vallès, 2007)
	Diurético	(Calvo & Caverro, 2014; Cornara et al., 2009; Giachetti et al., 1986; Menale et al., 2022)
	Depurativo sanguíneo	(Calvo & Caverro, 2014; F. Freitas & Mateus, 2013; Menale et al., 2022)
	Hipertensão arterial	(Sequeira et al., 2006)
	Antirreumático	(Cornara et al., 2009)
	Distúrbios Musculoesquelético: hematomas e entorses.	(Menale et al., 2022)
	Distúrbios Sistema Respiratório: tosse; catarro; bronquite, faringite	(Fortini et al., 2016)
	Distúrbios Gastrointestinais: dores estômago e intestino; prisão de ventre; diarreia.	(Cornara et al., 2009; Freitas & Mateus, 2013; Sequeira et al., 2006)
	Dores de cabeça	(Sequeira et al., 2006)
	Sedativo	(Ozturk et al., 2017)
	Feridas e picadas de insetos	(Cornara et al., 2009; Fortini et al., 2016)
	Gengivites	(Cornara et al., 2009)

Tabela 3. Usos tradicionais e atividades biológicas descritas na literatura para a *P. aviculare*.

Espécie	Usos Tradicionais/ Atividades Biológicas	Referências
<i>P. aviculare</i>	Antibacteriano	(Salama & Marraiki, 2010)
	Anti-helmíntico	(Mathe & Reizenstein, 1985)
	Anti-inflamatório	(Granica et al., 2013; Jeon et al., 2013; Park et al., 2018; Tunon et al., 1995)
	Antioxidante	(Gan et al., 2010; Hsu, 2006a; Yang et al., 2015)
	Citotoxicidade (Apoptose celular)	(Habibi et al., 2011)
	Distúrbios Geniturinário	(da Cunha et al., 2009; Freitas & Mateus, 2013; Sequeira et al., 2006)
	Dor lombar pós-parto;	(Ligaa et al., 2005)
	Sistema respiratório: inflamação das vias respiratórias e catarro.	(da Cunha et al., 2009)
	Consolidação de fraturas	(da Cunha et al., 2009)
	Diurético	(Choudhary et al., 2011; da Cunha et al., 2009; Mathe & Reizenstein, 1985; Yin et al., 2005)
	Distúrbios do Sistema Cardiovascular: Hipertensão arterial, diminuição da placa aterosclerótica e diminuição gordura corporal	(Park et al., 2014; Sung et al., 2013; Yin et al., 2005)
	Hemorroidas	da Cunha et al., 2009; Mathe & Reizenstein, 1985)
	Feridas	(Choudhary et al., 2011; Seo et al., 2016; Tunon et al., 1995)
	Inseticida	(Mathe & Reizenstein, 1985; Yin et al., 2005)
Gengivite	(Begné et al., 2001; da Cunha et al., 2009)	

Tabela 4. Usos tradicionais e atividades biológicas descritas na literatura para a *P. galioides*.

Espécie	Usos Tradicionais/ Atividades Biológicas	Referências
<i>P. galioides</i>	Antibacteriano	(de Feo et al., 2008; Langfield et al., 2004; Neto et al., 2002)
	Anti-inflamatório: inflamação auricular, papeira, pós-parto (uso externo)	(de Feo, 1992; Peñaherrera et al., 2016; Wilches et al., 2021)
	Antiparasitário	(Mahiou et al., 1995, 1996)
	Sedativo e hipnótico	(Wilches et al., 2021)
	Distúrbios Gastrointestinais: úlceras gástricas, diarreia e má disposição	(Aponte et al., 2009; de la Cruz et al., 2014; Freitas & Mateus, 2013; Hammond et al., 1998; Sequeira et al., 2006)
	Distúrbios Geniturinários: dismenorrea.	(Sequeira et al., 2006)
	Cicatrização de feridas	(Villegas et al., 1997, 2001)
	Dores de cabeça	(Freitas & Mateus, 2013)
	"Susto"	(Tene et al., 2007)

* Também designado por “Espanto” um síndrome que está ligado à Cultura segundo a designação do DMS-5. É utilizado pelos povos da América Central e do Sul para descrever um conjunto de sintomas psicológicos (como ansiedade, dificuldades em dormir e falta de motivação) após um evento traumático. Este síndrome não é reconhecido pela comunidade médica ocidental (Weller & Triana, 2014).

1.3.3. *Laurobasidium lauri*

Na floresta Laurissilva madeirense, a espécie predominante é o *L. novocanariensis* (Rodilla et al., 2008). Esta espécie serve de hospedeira para o fungo parasita *Laurobasidium lauri* (Madre-de-louro), tendo este sido também encontrado nos Açores e na Península Ibérica, em espécies de *L. azorica* e *L. nobilis*. O fungo pertence à família *Exobasidiaceae* e parasita exclusivamente árvores com mais de 10 anos do género *Laurus*. Inicialmente forma tumefações no tronco que, posteriormente, origina excrescências sob a forma de galhos ou hastes, que surgem na Primavera, com tons esverdeados ou acastanhados (quando atingem a maturidade)(Arroyo-García et al., 2001; Calonge & Mir-Pegueroles, 2015; Morais, 1987; Sequeira et al., 2006).



Figura 10. *Laurobasidium lauri* (Madre-de-louro) (fonte: fotografias captadas pela autora).

1.3.3.1 Utilizações tradicionais

O *L. lauri* é um fungo utilizado na medicina popular madeirense, na forma de pó e como tintura alcoólica, atuando como hemostático, hemagogo, tónico, anti-reumático e como inseticida (Rivera & Obón, 1995). Como infusão é usado no tratamento de problemas do sistema circulatório e da pele; e como macerado em 55% de álcool é usado para alterações do sistema nervoso, reumatismo e dores lombares, e, em particular, no tratamento de desordens uterinas (Freitas & Mateus, 2013; Martin et al., 1988; Sequeira et al., 2006).

Estudos sobre os usos populares na freguesia da Ilha (concelho de Santana) mencionam a ingestão de um pequeno cálice, para dores de barriga e má disposição, de uma infusão em aguardente preparada com este fungo, botões de macela (ou camomila) e caninha (ou erva-príncipe) (*Cymbopogon citratus*). Como referido no capítulo anterior, é também utilizado nas mulheres, em período de pós-parto, um cálice pequeno de uma infusão em aguardente com

alfavaca (*P. judaica*), sempre-noiva (*P. aviculare*), canela-branca (*P. galioides*) e madre-de-louro (Rivera & Obón, 1995; Sequeira et al., 2006).

1.3.3.2 Composição química

Alguns fungos são altamente especializados em parasitar organismos vivos, porém, nem todos produzem doença. Alguns entram num período de latência durante todo o período de vida do hospedeiro ou até as condições se alterarem (Sieber, 2007). Neste período, várias reações de simbiose ocorrem, tanto em favor do parasita como do hospedeiro (Kusari et al., 2012). Nesse sentido, a investigação de novas espécies de cogumelos, principalmente aquelas que parasitam plantas medicinais, abre portas à descoberta de novos compostos, com potencial terapêutico (Dhayanithy et al., 2019; Kusari et al., 2012). Os cogumelos medicinais são comparáveis às plantas medicinais, pois os seus extratos podem ser utilizados para prevenir, aliviar ou, eventualmente, curar doenças (Wasser, 2014).

Em relação ao *L. lauri* existem poucos estudos acerca desta espécie, principalmente que explorem as suas atividades biológicas, apesar da sua utilização popular na região como espécie medicinal. Quanto à sua composição, alguns estudos salientam a presença de alcalóides, nomeadamente a reticulina (Martin et al., 1988), de lactonas sesquiterpénicas, como a costunolida e a dehidrocostus (Carvalho, 2010; Morais, 1987) e ainda catequinas, em particular as procianidinas do tipo A (Serina et al., 2016).

1.3.3.2.1 Reticulina

Muitas espécies da família das Lauráceas apresentam na sua constituição alcalóides, sendo os alcalóides isoquinoleicos a classe com maior representação (Barbosa-Filho et al., 2000; Teles et al., 2019). A reticulina foi também identificada no *L. nobilis* (Pech & Bruneton, 1982).

A reticulina é um alcalóide benzilisoquinoleico (Figura 11), derivado da tirosina (Liscombe & Facchini, 2008) e precursor da biossíntese de vários alcalóides (Fossati et al., 2015), como a morfina. Além da morfina, é também intermediário de outros alcalóides benzilisoquinoleicos não narcóticos que poderão ter interesse no desenvolvimento de fármacos antiparasitários (Camacho et al., 2002; Rasoanaivo et al., 1998; Tshibangu et al., 2003) e anticancerígenos (Chen et al., 2002; Seifert et al., 1996).

A reticulina possui atividade anti-inflamatória (de Alcântara et al., 2021; Yang et al., 2018); atua como relaxante do músculo liso, interferindo nos canais de cálcio (Ca^{2+}) (Martin et al., 1993; Martin et al., 1988), efeito este já confirmado por Medeiros et al., (2009); diminui a tensão arterial (em modelos animais) (Dias et al., 2004); além de apresentar efeitos ao nível do Sistema Nervoso

Central (alterações nos hábitos de sono e na coordenação motora) (Morais et al., 1998) e potencial efeitos nas células capilares, acelerando o crescimento do cabelo (Nakaoji et al., 1997).

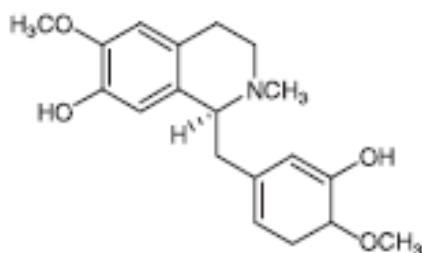


Figura 11. Estrutura química da reticulina (Nakagawa et al., 2012)

1.3.3.2 Lactonas sesquiterpénicas

As lactonas sesquiterpénicas são uma classe de metabolitos secundários presentes em muitas plantas e que possuem inúmeras atividades biológicas (Barrios, 2018; Hohmann et al., 2016). São compostos terpénicos caracterizados por terem 15 carbonos e um anel γ -lactona com um grupo α -metileno (Chen et al., 2014; Picman, 1986).

A costunolida e o dehidrocostonus são lactonas sesquiterpénicas encontradas numa variedade de plantas, incluindo o *L. nobilis* (Conforti et al., 2006; Naveen et al., 2018), *L. novocanariensis* (Ferrari et al., 2005; Luna-Herrera et al., 2007) e *L. Azorica* (Viveiros et al., 2022).

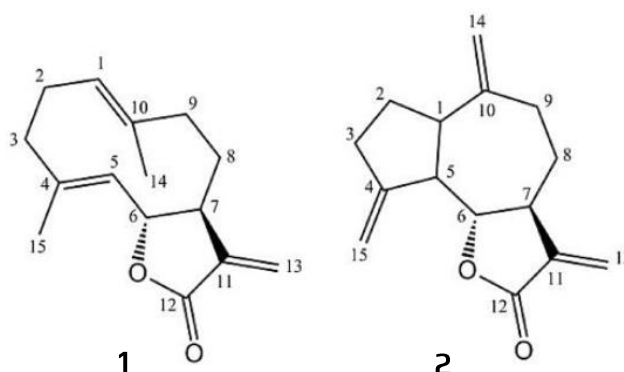


Figura 12. Estrutura química da costunolida (1) e do dehidrocostonus (2) (Li et al 2020).

A estas duas lactonas sesquiterpénicas são atribuídas inúmeras atividades biológicas, tais como: antioxidante (Eliza et al., 2010); anti-inflamatória (Butturini et al., 2014; Choodej et al., 2018); anti-ulcerosa (Matsuda et al., 2000; Yoshikawa et al., 2000); antibacteriana (Park et al., 1997) e que, segundo a investigação de (Luna-Herrera et al., 2007), comprovou que as duas lactonas têm ação sinérgica, tendo maior atividade antibacteriana juntas do que em separado; antifúngica (Barrero et al., 2000; Wedge et al., 2000); anticancerígena (Okubo et al., 2021), induzindo a apoptose em várias linhas celulares (Choi et al., 2002; Lee et al., 2021; Peng et al., 2017) e possivelmente antialérgica (Seo et al., 2015). Além disso possuem propriedades antivirais e

hepatoprotetoras (Chen et al., 1995) e de manutenção da estrutura óssea (Lee et al., 2019; Lee & Choi, 2011). Outros estudos demonstraram que a presença da costunolida e do dehidrocostus previne o aumento da concentração de álcool no sangue (Matsuda et al., 2000, 2002; Yoshikawa et al., 2000). Chegou-se à conclusão de que a presença de um anel α -metileno- γ -butirolactona (α -MGBL) nestes compostos parece ser o responsável pela inibição do esvaziamento do conteúdo gástrico, aumentando assim o tempo de exposição do álcool à enzima álcool desidrogenase e a sua metabolização, antes de atingir a corrente sanguínea (Matsuda et al., 2002). Tinoco et al., (2009) confirmou estes dados utilizando um extrato hexânico das folhas de *L. novocanariensis* (rico em costunolida e dihidrocostus) verificando o efeito gastroprotetor contra lesões provocadas pelo álcool.

1.4. Objetivos

Para o estabelecimento de objetivos no decurso desta dissertação, teve-se em conta algumas premissas, nomeadamente: a ocorrência do *L. lauri* (Madre-de-louro) na ilha da Madeira, não esquecendo a sua origem e o impacto da mesma no meio onde nasce; o seu uso popular na região de forma isolada ou em mistura com plantas medicinais; e a escassez de estudos que avaliem as potenciais atividades biológicas do fungo e possível relação com a composição.

Posto isto, o estudo tem como principal objetivo avaliar potenciais atividades biológicas do fungo *L. lauri* (Madre-de-louro), proveniente da ilha da Madeira, de forma isolada e em mistura com plantas medicinais. E como objetivos específicos:

- Determinar o teor de compostos fenólicos totais (TPC) de extratos aquosos e hidroalcoólicos de *L. lauri*;
- Avaliar a atividade antioxidante, antibacteriana, anti-inflamatória e citotóxica de extratos aquosos e hidroalcoólicos de *L. lauri*;
- Avaliar a atividade antioxidante, antibacteriana, anti-inflamatória e citotóxica de extratos aquosos e hidroalcoólicos de *L. lauri* em mistura com plantas medicinais, popularmente utilizadas com o fungo.
- Discutir os resultados encontrados nos diferentes ensaios com a literatura.

2. Métodos

Trata-se de um trabalho experimental realizado nas instalações do Centro de Investigação em Saúde e Ambiente (CISA), da Escola Superior de Saúde, do Instituto Politécnico do Porto (ESS-IPP).

2.1. Reagentes

O dimetilsulfóxido (DMSO), o sulfato de ferro (II), o carbonato de sódio anidro, e o reagente Folin-Ciocalteu, foram obtidos da empresa VWR Chemicals (Portugal). O *Mueller-Hinton broth*, o *Mueller-Hinton agar*, o *Nutrient broth*, e o agar bacteriológico foram obtidos da Frilabo (Portugal). A quercetina, o ácido gálico, o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), o cloreto de sódio, o hidrato de sal monosódico do ácido 5,6-difenil-3-(2-piridil)-1,2,4-triazina-4,4"-disulfónico (ferrozina), o 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH), a clindamicina, e a resazurina foram obtidos da Sigma-Aldrich (EUA). O etanol e o meio de cultura RPMI 1640 foram adquiridos à Fisher Scientific (França). Por sua vez, o kit *Lipoxygenase Inhibitor Screening Assay* foi adquirido à Cayman Chemical Company (USA). Os restantes compostos químicos e solventes de grau analítico foram adquiridos a fornecedores especializados.

2.2. Recolha e preparação dos extratos

As espécies utilizadas no estudo, nomeadamente o fungo *L. lauri* e as plantas a utilizar em mistura: a alfavaca (*Parietaria judaica*), a sempre-noiva (*Polygonum aviculare*) e a canela-branca (*Peperomia galioides*) foram adquiridas secas, em loja tradicional no Mercado dos Lavradores, na região da Madeira, devidamente identificadas (Anexos 1 e 2).

O fungo e as plantas secas foram reduzidos a pó em moinho (da Taurus). No caso do fungo *L. lauri*, este foi submetido a um processo extrativo, recorrendo a dois solventes – água destilada e etanol 55% (V/V). O procedimento utilizado para a obtenção do extrato etanólico encontra-se descrito no estudo de (Hu et al., 2009) com ligeiras modificações. Resumidamente, a amostra foi submetida a uma maceração (razão amostra/solvente de 1:10), com etanol 55% (V/V), por 24h, com agitação em placa de aquecimento com agitação (da VWR), à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

Para a obtenção do extrato aquoso do fungo, foi seguido o procedimento descrito por Guimarães et al., (2011), com modificações. Para tal, realizou-se uma infusão adicionando-se água destilada a ferver à amostra (razão amostra/solvente de 1:10) e deixando repousar por 5 minutos.

Os procedimentos extrativos acima descritos para o fungo isolado foram efetuados também para o fungo em mistura com plantas medicinais popularmente utilizadas (alfavaca, a sempre noiva e a canela-branca). Tanto para o extrato aquoso como para o etanólico, pesou-se porções

iguais de cada uma das plantas e do fungo e adicionou-se o solvente como descrito anteriormente na razão amostra/solvente de 1:10.

Todas as soluções extrativas obtidas foram filtradas (papel de filtro nº 1 Whatman), concentradas em evaporador rotativo (VWR, IkaRV8) (no caso das soluções extrativas etanólicas) e liofilizadas (LABCONCO FreeZone series) (soluções extrativas aquosas e etanólicas). O pó resultante foi armazenado a -80°C .

2.3. Ensaios relacionados com a atividade antioxidante

2.3.1. Determinação do teor dos compostos fenólicos totais

O ensaio de Folin-Coicalteu, por ser fácil, rápido e barato, é a técnica mais utilizada para a determinação de TPC. O ensaio consiste numa reação redox, em que, num meio alcalino, a presença de polifenóis leva à redução do reagente Folin-Coicalteu que forma um complexo azul. Este complexo pode ser quantificado através de espectrofotometria (Blainski et al., 2013).

Para a determinação do TPC, uma alíquota (1 mL) das soluções extrativas foi misturada com reagente Folin-Coicalteu (5 mL, previamente diluído com água a 1:10, V/V) e carbonato de sódio (75 g/L, 4 mL). Os tubos foram agitados durante 15 segundos e deixados em repouso durante 30 minutos, a 40°C para o desenvolvimento de cor. Após o final da reação, foi medida a absorvância a 765 nm, em espectrofotómetro (Jenway 6300). Para o cálculo da curva padrão foi usado o ácido gálico, com os resultados expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (GAE) por grama de amostra (Guimarães et al., 2011).

2.3.2. Ensaio do DPPH

O ensaio do DPPH é um ensaio colorimétrico que consiste numa reação antioxidante utilizando um radical orgânico (DPPH·). A neutralização do radical ocorre através da doação de eletrões por parte do antioxidante, que provoca alteração da sua coloração de púrpura para amarelo-pálido. A reação é medida a 517 nm, é frequentemente obtida sob a forma de IC_{50} , que se define como a concentração de antioxidante necessária para reduzir a concentração inicial de DPPH em 50% (Foti, 2015; Munteanu & Apetrei, 2021).

O ensaio do radical DPPH realizou-se conforme o descrito por (Lima et al., 2007). Para tal, selecionaram-se diferentes concentrações (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a testar para cada um dos extratos. A cada uma das concentrações foi adicionada a solução de DPPH (90 μM) numa microplaca de 96 poços. A redução do radical DPPH foi avaliada em intervalos de 5 minutos até ao fim da reação através da leitura da absorvância a 515 nm, em leitor de microplacas (Dynex Technologies MRX II Microplate Reader). A atividade captadora de radicais livres (RSA) foi calculada usando a equação: % RSA =

$[(ADPPH - AS)/ADPPH] \times 100$, em que AS é a absorvância da solução na presença de extrato numa determinada concentração; e ADPPH é a absorvância da solução de DPPH (controlo). A concentração de extrato correspondente a 50% da atividade captadora de radicais (IC_{50}) foi igualmente calculada.

2.3.3. Determinação da capacidade quelante do ferro (Fe^{2+})

A capacidade quelante do Fe^{2+} (também designado de ensaio da ferrozina) é um ensaio colorimétrico simples e baseia-se na reação entre a ferrozina com o ião Fe^{2+} que forma um complexo de cor violeta. Quando formação do complexo é interrompida na presença de agentes quelantes, a cor do complexo diminui (Perron & Brumaghim, 2009)

O ensaio da quelação do Fe^{2+} foi realizado de acordo com o descrito por (Russo et al., 2005). De forma sucinta, a 50 μ l de cada uma das concentrações, entre 1 μ g/mL a 1000 μ g/mL dos extratos a testar, em microplacas de 96 poços, foram adicionados 50 μ L de sulfato ferroso (0,12 mM) e 50 μ l de ferrozina (0,6 mM). Como controlo positivo utilizou-se o EDTA. Após agitação manual da placa, esta foi deixada à temperatura ambiente e protegida da luz, por 10 minutos. A absorvância foi lida a 562 nm, num leitor de microplacas (Dy nex Technologies MRX II Microplate Reader). A percentagem de atividade quelante do ferro foi calculada através da seguinte equação: $ICA (\%) = 100 \times [(Ab_c - Ab_s)/Ab_c]$, em que Ab_c é a absorvância do controlo e Ab_s é a absorvância das amostras. A concentração de extrato correspondente a 50% da quelação do ferro (IC_{50}) foi igualmente calculada.

2.4. Ensaio de inibição da lipoxigenase (5-LOX)

Este ensaio baseia-se na deteção dos LOOH que são produzidos numa reação de lipoxigenação, utilizando uma lipoxigenase purificada. É útil na deteção de lipoxigenases e quando se pretende avaliar a capacidade de um composto inibir a enzima 5-lipoxigenase (*5-lipoxygenase assay kit (catalog no. KA1329, Version 10) – Abnova*).

Para o ensaio, os extratos a analisar foram testados usando um kit (*LOX inhibitor screening assay*) seguindo o protocolo recomendado (*5-lipoxygenase assay kit (catalog no. KA1329, Version 10) – Abnova*). O ensaio de inibição da LOX mede a quantidade de hidroperóxidos produzidos durante a incubação da enzima 5-LOX com o substrato (ácido araquidónico). O ácido nordihidroguaiarético (NGDA) foi usado como controlo positivo. Brevemente, selecionou-se as concentrações a testar (105 μ g/mL – 10500 μ g/mL) para cada um dos extratos. Retirou-se um volume de 10 μ L de cada extrato a analisar que foi pré-incubado com 90 μ L da enzima 5-LOX numa microplaca de 96 poços. A reação iniciou-se com a adição de 10 μ L de ácido araquidónico e posterior agitação por 5 minutos. De seguida, 100 μ L do cromogénio do kit foi adicionado para

parar a reação enzimática e observar o desenvolvimento de cor. A placa foi agitada por mais 5 minutos e lida a uma absorvância a 490 nm, num leitor de microplacas (Dynex Technologies MRX II Microplate Reader).

2.5. Testes de suscetibilidade antibacteriana

2.5.1. Estirpes bacterianas e condições de cultura

Foram utilizadas duas bactérias para os ensaios, uma Gram-negativa, a *Escherichia coli* (DSM 1576) e uma Gram-positiva (*Staphylococcus aureus*) (DSM 346). Seguindo as normas do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), as bactérias, conservadas em glicerol a -80°C , foram descongeladas e, com o auxílio de uma zaragatoa, transferidas para um tubo de ensaio contendo meio *Mueller–Hinton uBroth* (5 mL). A incubação foi feita a 37°C durante 20h. Após crescimento bacteriano, procedeu-se à inoculação das bactérias em meio *Nutrient Agar* (NA), através da técnica do riscado, sendo novamente incubadas a 37°C por mais 20h.

2.5.2. Determinação da atividade antibacteriana

Preparou-se a suspensão das bactérias, previamente inoculadas em meio *Nutrient Agar*, em *Mueller–Hinton Broth* com o auxílio de uma zaragatoa estéril. Após agitação da suspensão procedeu-se à leitura da sua absorvância (625 nm), até se obter uma absorvância aproximada a 0,8 – 0,13 – correspondendo visualmente à turbidez padrão de 0,5 McFarland (EUCAST, 2021a).

2.5.3. Ensaio de difusão em disco

Este ensaio consiste em avaliar a sensibilidade de compostos com potencial atividade antibacteriana, e foi realizado conforme descrito por (Klančnik et al., 2010) e EUCAST, (2021), com ligeiras modificações. As bactérias, foram inoculadas a partir da suspensão bacteriana em placas de petri contendo meio *Mueller–Hinton Agar* e os discos brancos estéreis aplicados na placa, e impregnados com diferentes concentrações dos extratos: 1 mg/mL, 5 mg/mL e 10 mg/mL. O controlo positivo foi feito com discos impregnados com ciprofloxacina 5 μg /disco. Como controlo negativo foram utilizados os solventes em estudo (água destilada e etanol 55% (V/V)). A incubação das placas foi feita a 37°C por 24h até crescimento bacteriano. Os resultados foram determinados medindo o diâmetro do halo de inibição.

2.5.4. Ensaio da microdiluição

Para determinar a concentração mínima inibitória (MIC), utilizou-se com algumas modificações, o ensaio da microdiluição descrito por (King et al., 2008). Neste ensaio, as concentrações testadas

variaram entre 0,0390625 mg/mL e 1,25 mg/mL. Numa microplaca de 96 poços, e partindo de uma concentração inicial de extrato, realizou-se uma série de diluições sucessivas (1:2).

Foi preparada uma suspensão bacteriana em MHB, ajustada à escala de Farland (10^8 CFU/mL), que foi posteriormente diluída (1:1000) de modo a se obter densidade de inoculação de 5×10^5 CFU/mL. Esta solução foi adicionada aos poços. Além do descrito, foi realizado um controlo (com 200 μ L de meio MHB) e um controlo de crescimento bacteriano (com 200 μ L de suspensão bacteriana). A clindamicina, com concentrações entre 0,25 mg/mL – 0,0078 mg/mL, foi utilizada como controlo positivo. A placa foi incubada a 37 °C entre 16 a 24h. Após este período avaliou-se a MIC nos poços em que não se verificou crescimento visível (turbidez). Para confirmar este resultado, inoculou-se uma placa NA mergulhando uma zaragatoa no poço onde se verificou o MIC, de modo a confirmar a ausência de crescimento (EUCAST, 2021b). O MIC corresponde à menor concentração do extrato da planta que inibiu o crescimento bacteriano a 100%. O ensaio da resazurina foi utilizado para confirmar os resultados.

2.5.5. Ensaio da resazurina

O ensaio da resazurina é uma técnica colorimétrica que permite-nos avaliar a atividade metabólica bacteriana. A resazurina, de cor azul, na presença de bactérias metabolicamente ativas é metabolizada em resorufina, de cor rosa fluorescente. Este ensaio pode ser utilizado como complemento na determinação do valor do MIC com maior precisão (Elshikh et al., 2016).

A resazurina foi preparada a 0,015%, filtrada (com filtro de 0,22 μ m) e armazenada a 4 °C por um máximo de duas semanas após a preparação. Para o ensaio, o inóculo foi preparado tendo em concordância com as recomendações da CSLI em que o valor OD600 foi ajustado para o equivalente a 10^8 CFU/ml. As suspensões bacterianas foram depois diluídas em meio líquido MHB (1:100). De seguida, 50 μ l da suspensão ajustada foi adicionada à placa de 96 poços, contendo os extratos e aos controlos, resultando em aproximadamente 5×10^5 CFU/ml. As concentrações testadas dos extratos variaram entre 0,25 mg/mL – 0,0078 mg/mL. Após a incubação da placa por 24h a 37 °C, a resazurina (0,015%) foi adicionada aos poços (30 μ l por poço), e novamente incubada por 2-4h para observação da cor formada. Após o tempo completo de incubação, os poços sem alteração de cor (a cor azul da resazurina mantém-se inalterada) foram pontuados como acima do valor de MIC (Elshikh et al., 2016)

2.6. Ensaio de citotoxicidade

2.6.1. Linhas celulares e condições de cultura

Para os ensaios utilizou-se uma linhagem celular de cancro do pulmão (A549) obtida da *American Type Culture Collection* (ATCC). As células foram mantidas em frascos de cultura de 25

cm², meio RPMI 1640 com mistura de antibiótico-antimicótico (1%) e soro bovino fetal (10%), em incubadora com atmosfera humidificada (5% CO₂/95% ar) e 37°C. A subcultura foi feita após as células atingirem os 80% de confluência.

2.6.2. Ensaio do MTT

O efeito dos extratos de fungo (isolado e em mistura) na viabilidade celular de células A549 foi avaliado pelo ensaio colorimétrico de MTT (Mosmann, 1983). Este ensaio é utilizado quando se pretende avaliar a proliferação/viabilidade celular, citotoxicidade de um composto ou a atividade metabólica das células. Baseia-se na redução do reagente MTT por células metabolicamente ativas em formazano, um composto azulado e insolúvel (Ghasemi et al., 2021).

Resumidamente, as células foram incubadas em placas de 96 poços com uma densidade de $0,6 \times 10^5$ de células por poço, 48h antes da incubação com os extratos. As células foram depois tratadas com diferentes concentrações dos extratos (entre 5 µg/ml e 1000 µg/ml), em meio RPMI por 24 e 48h. Após o período de incubação, a solução de MTT (0,5 mg/ml) foi adicionada a cada poço por 1h. Após esse tempo, o meio foi removido e os cristais de formazano formados, foram dissolvidos numa solução de DMSO:etanol a 50:50 (V/V). O número de células viáveis foi estimado pela capacidade de as células reduzirem o MTT, e absorvância determinada a 570 nm, usando um leitor de microplacas. Os resultados foram expressos em % de viabilidade celular através da fórmula: $(\text{Absorvância da amostra} - \text{Absorvância do branco}) / (\text{Absorvância do Controlo} - \text{Absorvância do Branco}) \times 100$. Como branco utilizou-se a solução de DMSO/etanol absoluto. Calculou-se a concentração de extrato capaz de diminuir em 50% o número de células viáveis (IC₅₀), utilizando o programa GraphPad Prism®.

2.7. Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média ± desvio padrão de pelo menos três ensaios independentes. Os dados foram analisados e comparados através do teste one way ANOVA, seguido do teste de múltipla comparação de Dunnett, usando o programa estatístico GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA). As diferenças com valores de $p \leq 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas.

3. Resultados

3.1. Avaliação do potencial antioxidante

A atividade antioxidante de extratos aquosos e etanólicos do fungo *L. lauri* isolado e *L. lauri* em mistura com plantas medicinais de uso tradicional na Madeira foi avaliada através de métodos bastante comuns, como o ensaio do radical DPPH· e o ensaio da ferrozina. A tabela seguinte resume os valores em IC₅₀, para os ensaios de DPPH e ferrozina (Tabela 5). Observou-se que, tanto para o ensaio do DPPH, como para o ensaio da ferrozina a atividade antioxidante foi dependente da concentração (dados não apresentados).

Tabela 5. Atividade *in vitro* dos extratos aquosos e etanólicos do fungo isolado e em mistura com plantas medicinais, assim como dos respetivos controlos positivos (quercetina e EDTA).

Extratos	Ensaio do Radical DPPH· (IC ₅₀ , µg/mL)			Ensaio da Ferrozina (IC ₅₀ , µg/mL)		
	Aquoso	Etanólico 55% (V/V)	Quercetina	Aquoso	Etanólico 55% (V/V)	EDTA
<i>L. lauri</i> isolado	69,8 ± 5,5 ^a	18,9 ± 2,2 ^b	1,8 ± 0,2 ^c	444,8 ± 15,5 ^a	460,7 ± 14,9 ^a	1,2 ± 0,0 ^c
<i>L. lauri</i> mistura	244,3 ± 2,1 ^a	100,5 ± 9,8 ^b		347,7 ± 10,8 ^a	163,7 ± 3,1 ^b	

Os valores de IC₅₀ (µg/mL) foram expressos como a média ± desvio padrão de três ensaios independentes (n = 3). Comparações múltiplas foram feitas entre extratos aquosos e etanólicos para *L. lauri* isolado e em mistura, e o controlo positivo. Diferenças significativas ($p \leq 0.05$) estão representadas por letras diferentes.

Analisando os dados, e relativamente ao ensaio do radical DPPH·, os melhores valores foram observados para o fungo isolado, tanto no extrato aquoso (IC₅₀ = 69,8 ± 5,5 µg/mL), como para o extrato etanólico 55% (V/V) (IC₅₀ = 18,9 ± 2,2 µg/mL). No caso do ensaio da ferrozina, os melhores valores de atividade antioxidante foram encontrados para o fungo em mistura com plantas medicinais de uso tradicional, em particular para o extrato etanólico (IC₅₀ = 163,7 ± 3,1 µg/mL). Porém, para qualquer um dos casos mencionados, os valores de IC₅₀ dos controlos positivos foram sempre menores (IC₅₀ = 1,8 ± 0,2 µg/mL para a quercetina e IC₅₀ = 1,2 ± 0,0 µg/mL para o EDTA).

No que diz respeito aos valores encontrados para o TPC (Tabela 6) os maiores teores foram observados para os extratos de *L. lauri* isolado (268,0 ± 17,3 mg GAE/g e 139,4 ± 26,2 mg GAE/g para o extrato etanólico 55% (V/V) e aquoso, respetivamente). No caso do extrato de *L. lauri* isolado observaram-se diferenças estatisticamente significativas entre o aquoso e o etanólico ($p < 0,05$). O maior TPC correspondeu ao extratos com melhor atividade antioxidante observada no ensaio do radical DPPH· (extrato *L. lauri* isolado e etanólico).

Tabela 6. Teor de compostos fenólicos totais nos extratos aquoso e etanólico 55% (V/V) do *L. lauri* isolado e *L. lauri* em mistura.

Extratos	Teor de compostos fenólicos totais (mg GAE/g)	
	Extrato Aquoso	Extrato Étanólico 55% (V/V)
<i>L. lauri</i> isolado	139,4 ± 26,2 ^a	268,0 ± 17,3 ^b
<i>L. lauri</i> em mistura	81,3 ± 3,9 ^a	87,9 ± 6,1 ^a

GAE: equivalentes de ácido gálico. Os resultados são expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (GAE) por grama de extrato seco, e os valores são a média ± desvio padrão de 3 ensaios independentes (n = 3). As comparações entre os extratos aquosos e etanólicos 55% (V/V) de fungo isolado e em mistura foram feitas, e as diferenças significativas ($p \leq 0.05$) estão representadas com letras diferentes.

3.2. Avaliação da atividade anti-inflamatória

A tabela seguinte (Tabelas 7, 8, 9 e 10) resume os efeitos dos diferentes extratos com *L. lauri* na inibição da LOX-5. Pelos resultados das tabelas é possível observar que apenas os extratos com o fungo *L. lauri* isolado demonstraram inibição da LOX, dependente das três concentrações estudadas (5 µg/mL, 50 µg/mL e 500 µg/mL). No caso dos extratos com *L. lauri* isolado, o extrato aquoso demonstrou a maior percentagem de inibição, na concentração de 500 µg/mL (68,9%). Para a mesma concentração, o extrato etanólico 55% (V/V) de *L. lauri* isolado obteve uma percentagem de inibição da LOX de 58,2%.

Tabela 7. Efeito do extrato aquoso de *L. lauri* isolado na inibição da LOX.

Recetor/Enzima	Fonte	Substrato	% Inibição Controlo		% Inibição <i>L. lauri</i> (aquoso isolado)		
			Controlo	% Inibição	5 µg/mL	50 µg/mL	500 µg/mL
5-LOX	Lipoxigenase recombinante humana	Ácido araquidónico	NGDA (100 µM)	100%	0	29,1	68,9

Tabela 8. Efeito do extrato aquoso de *L. lauri* em mistura na inibição da LOX.

Recetor/Enzima	Fonte	Substrato	% Inibição Controlo		% Inibição <i>L. lauri</i> (aquoso mistura)		
			Controlo	% Inibição	5 µg/mL	50 µg/mL	500 µg/mL
5-LOX	Lipoxigenase recombinante humana	Ácido araquidónico	NGDA (100 µM)	100%	0	0	0

Tabela 9. Efeito do extrato etanólico de *L. lauri* isolado na inibição da LOX.

Recetor/Enzima	Fonte	Substrato	% Inibição Controlo		% Inibição <i>L. lauri</i> (etanólico isolado)		
			Controlo	% Inibição	5 µg/mL	50 µg/mL	500 µg/mL
5-LOX	Lipoxigenase recombinante humana	Ácido araquidónico	NGDA (100 µM)	100%	14,3	31,6	58,2

Tabela 10. Efeito do extrato etanólico de *L. lauri* em mistura na inibição da LOX.

Recetor/Enzima	Fonte	Substrato	% Inibição Controlo		% Inibição <i>L. lauri</i> (etanólico mistura)		
			Controlo	% Inibição	5 µg/mL	50 µg/mL	500 µg/mL
5-LOX	Lipoxigenase recombinante humana	Ácido araquidónico	NGDA (100 µM)	100%	0	0	0

3.3. Avaliação da atividade antibacteriana

A determinação da potencial atividade antibacteriana dos extratos do *L. lauri* isolado e do *L. lauri* em mistura foi realizada em duas estirpes bacterianas, o *Staphylococcus aureus* e a *Escherichia coli*. De acordo com os dados obtidos para os extratos aquosos, nenhuma concentração testada inibiu o crescimento da *E. coli* e *S. aureus*, à exceção do controlo ($35,33 \pm 1,03$; $23,00 \pm 1,58$, respetivamente) (Tabela 11).

Tabela 11. Diâmetro da zona de inibição (mm \pm DP; n=3) do extrato aquoso de *L. lauri* e de *L. lauri* em mistura nas concentrações de 1 mg/mL, 5 mg/mL e 10 mg/mL e da Ciprofloxacina 5 µg/disco, em placas inoculadas com *E. coli* e *S. aureus*.

	Extratos Aquosos (mm \pm DP)			
	<i>E. coli</i> (29-37 mm)		<i>S. aureus</i> (21-27 mm)	
	Extrato <i>L. lauri</i>	Extrato <i>L. lauri</i> + Mistura	Extrato <i>L. lauri</i>	Extrato <i>L. lauri</i> + Mistura
1 mg/mL	-	-	-	-
5 mg/mL	-	-	-	-
10 mg/mL	-	-	-	-
Ciprofloxacina		35,3 \pm 1,0		23,0 \pm 1,6

Em relação aos extratos etanólicos, estes demonstraram alguma atividade antibacteriana apenas para o *S. aureus*, quando comparado com o controlo ($24,0 \pm 1,0$). O *S. aureus* apresentou maior suscetibilidade ao fungo isolado, apresentando um halo de inibição de $16,3 \pm 2,5$ para a

concentração de 10 mg/mL. Já o extrato etanólico do fungo em mistura também apresentou atividade para a concentração 10 mg/mL ($12,0 \pm 1,7$) (Tabela 12).

Tendo em conta os resultados anteriores, apenas se realizou o ensaio da microdiluição no *S. aureus*, tendo em conta que foi a espécie bacteriana mais promissora para a ação dos extratos (Tabela 13). Assim, para os extratos aquosos, obtivemos um MIC de 5,0 mg/mL tanto para o fungo isolado como em mistura. Para os extratos etanólicos 55% (V/V), o valor do MIC foi de $7,8125 \times 10^{-2}$ mg/mL para o fungo isolado e para o fungo em mistura, o valor de MIC foi de $1,5625 \times 10^{-1}$ mg/mL. Note-se, que a clindamicina exibiu um valor de MIC de $1,5625 \times 10^{-5}$ mg/mL, mostrando-se assim mais eficaz do que os extratos em estudo.

Tabela 12. Diâmetro da zona de inibição (mm \pm DP; n=3) do extrato etanólico de *L. lauri* e de *L. lauri* em mistura nas concentrações de 1 mg/mL, 5 mg/mL e 10 mg/mL e da Ciprofloxacina 5 μ g/disco, em placas inoculadas com *E. coli* e *S. aureus*.

	Extratos Etanólicos 55% (mm \pm DP)			
	<i>E. coli</i> (29–37 mm)		<i>S. aureus</i> (21–27 mm)	
	<i>L. lauri</i>	<i>L. lauri</i> + Mistura	<i>L. lauri</i>	<i>L. lauri</i> + Mistura
1 mg/mL	-	-	-	-
5 mg/mL	-	-	-	-
10 mg/mL	-	-	$16,3 \pm 2,5$	$12,0 \pm 1,7$
Ciprofloxacina 5 μ /disco		$36,7 \pm 1,5$		$24,0 \pm 1,0$

Tabela 13. Determinação da concentração mínima inibitória (MIC) (mg/mL) dos extrato aquoso e etanólico 55% (V/V) de *L. lauri* isolado e de *L. lauri* em mistura sobre o *S. aureus*.

Extratos	MIC (mg/mL) – <i>S. aureus</i>		
	Extrato Aquoso	Extrato Etanólico 55% (V/V)	Clindamicina
<i>L. lauri</i> isolado	5,0	$7,8125 \times 10^{-2}$	$1,5625 \times 10^{-5}$
<i>L. lauri</i> mistura	5,0	$1,5625 \times 10^{-1}$	

3.4. Avaliação da citotoxicidade

De modo a avaliar a atividade citotóxica dos extratos (fungo isolado e em mistura), recorreu-se ao ensaio do MTT, de forma a observar os efeitos dos extratos no crescimento das células cancerígenas de pulmão (A549). As figuras seguintes (Figura 13, 14, 15 e 16) representam o efeito dos extratos de *L. lauri* na viabilidade celular (em %) face ao controlo, às 24h e às 48h. As concentrações estudadas variaram de 5 μ g/mL a 1000 μ g/mL e em todos os casos foi possível observar que tanto às 24h como às 48h, a viabilidade celular foi sempre dependente da concentração (diminuído à medida que a concentração aumenta). No caso do extrato aquoso de *L.*

lauri isolado, a % de viabilidade celular às 24h esteve sempre acima dos 75%, no entanto às 48h, na concentração de 1000 µg/mL observou-se uma % de viabilidade celular abaixo de 50% (Figura 13). Para este extrato, às 48h, o valor de IC₅₀ foi de 846 ± 3,5 µg/mL.

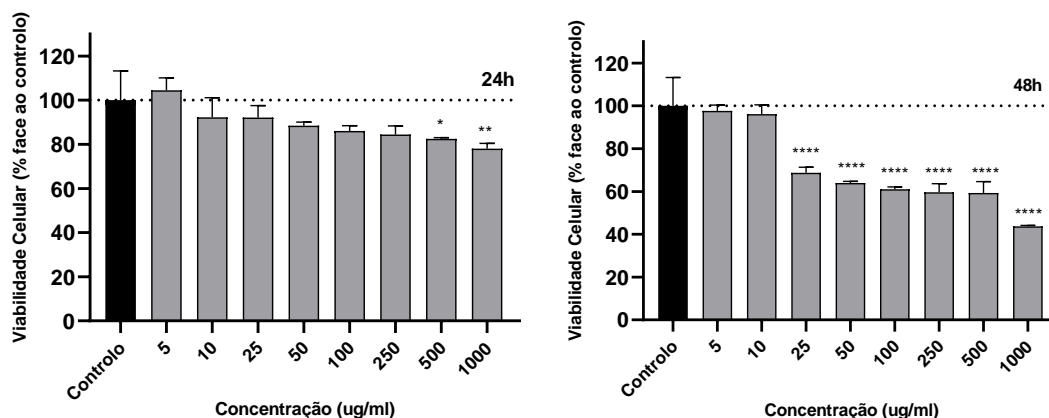


Figura 13. Citotoxicidade de diferentes concentrações do extrato aquoso de *L. lauri* isolado em células cancerígenas de pulmão (A549). Os dados representam a média ± desvio padrão de pelo menos três ensaios independentes, e as diferenças significativas em relação ao controlo foram estabelecidas para * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$ ****.

Para o extrato aquoso de *L. lauri* em mistura, a % de viabilidade celular às 24h esteve sempre acima dos 75%, enquanto às 48h esteve sempre acima dos 70%, denotando que este extrato não terá atividade citotóxica nas células estudadas (Figura 14).

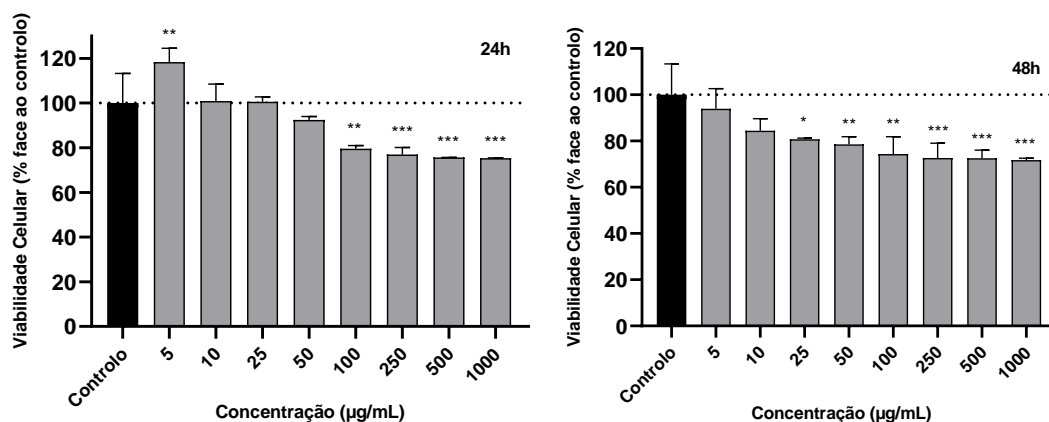


Figura 14. Citotoxicidade de diferentes concentrações do extrato aquoso de *L. lauri* em mistura em células cancerígenas de pulmão (A549). Os dados representam a média ± desvio padrão de pelo menos três ensaios independentes, e as diferenças significativas em relação ao controlo foram estabelecidas para * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Observando as figuras relativas aos extratos etanólicos verificou-se uma maior citotoxicidade para as concentrações estudadas. Para o extrato etanólico de *L. lauri* isolado, observou-se percentagens de viabilidade celular inferiores a 50%, nas concentrações iguais e inferiores a 250 µg/mL (às 24h) e iguais e inferiores a 100 µg/mL (às 48h) (Figura 15). Às 48h o valor de IC₅₀ foi de 72,1 ± 4,3 µg/mL.

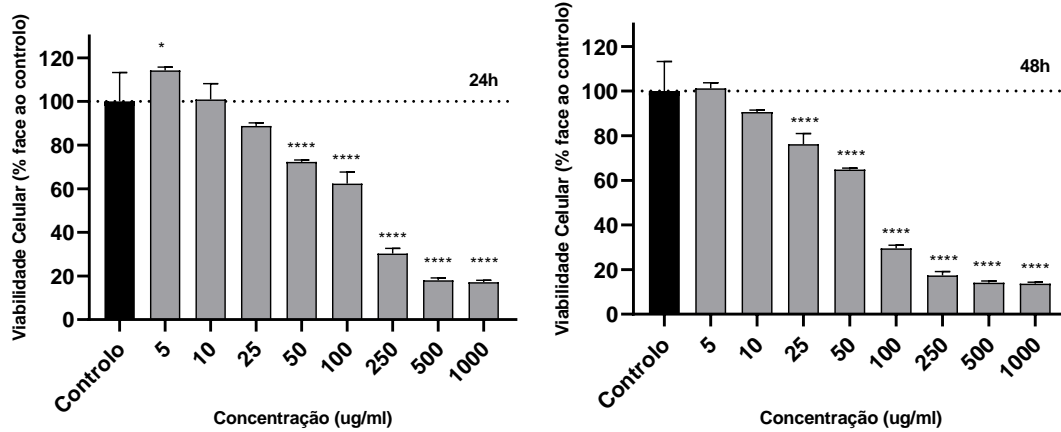


Figura 15- Citotoxicidade de diferentes concentrações do extrato etanólico de *L. lauri* isolado em células cancerígenas de pulmão (A549). Os dados representam a média \pm desvio padrão de pelo menos três ensaios independentes, e as diferenças significativas em relação ao controle foram estabelecidas para * $p < 0,05$, $p < 0,0001$ ****.

O extrato etanólico de *L. lauri* em mistura, foi o que apresentou uma maior citotoxicidade (Figura 16), apresentando um valor de IC_{50} de $48,3 \pm 1,0 \mu\text{g/mL}$, às 48h.

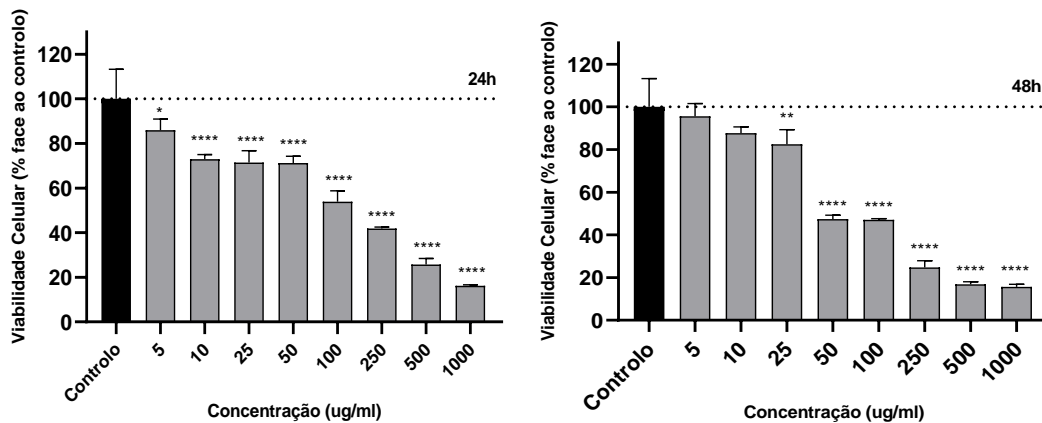


Figura 16. Citotoxicidade de diferentes concentrações do extrato etanólico de *L. lauri* em mistura em células cancerígenas de pulmão (A549). Os dados representam a média \pm desvio padrão de pelo menos três ensaios independentes, e as diferenças significativas em relação ao controle foram estabelecidas para * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, $p < 0,0001$ ****.

4. Discussão

Os fungos que parasitam plantas são importantes fontes de substâncias bioativas, podendo ser alvos para a pesquisa de novos compostos com atividades farmacológicas de interesse, como antioxidante, antibacteriana, anti-inflamatória ou anticancerígena (Mani et al., 2015; Wu et al., 2018). Vários metabolitos secundários têm sido identificados em fungos que parasitam plantas, como os compostos fenólicos, alcalóides, terpenos, esteróides e compostos aromáticos (Rocha et al., 2020).

Como já referido anteriormente, o fungo *L. lauri* (também conhecido na ilha da Madeira como Madre-de-Louro) tem sido utilizado popularmente na ilha, sob a forma de infusão, no tratamento de problemas circulatorios e de pele. Para além da infusão também se utiliza o fungo macerado em 55% de etanol para alterações do sistema nervoso, dor reumática e lombar, e especialmente no tratamento de problemas do trato urinário (Martin et al., 1989).

4.1. Atividade antioxidante dos extratos de *L. lauri*

Os radicais livres são conhecidos como indutores do dano oxidativo no organismo, podendo estar na origem de vários problemas como o cancro, cataratas, problemas cardíacos, diabetes mellitus, artrite e envelhecimento. Sabe-se que tanto as plantas como os seus fungos podem ser importantes fontes de moléculas com atividade antioxidante (Huang et al., 2007).

São muitos os ensaios existentes que medem diretamente a transferência de átomos de hidrogénio ou a transferência de eletrões dos antioxidantes para os radicais livres. No trabalho utilizou-se o ensaio colorimétrico do radical DPPH· onde temos uma reação antioxidante com um radical orgânico; e o ensaio da ferrozina (ou quelação do ferro) (Munteanu & Apetrei, 2021).

O ensaio do Folin-Ciocalteu é um método utilizado para determinação do conteúdo total de compostos fenólicos, em particular para quantificar polifenóis em extratos provenientes de plantas (Blainski et al., 2013).

Neste estudo, é possível verificar que os extratos de *L. lauri* isolado são os mais ricos em compostos fenólicos, com teores de $268,0 \pm 17,3$ mg GAE/g extrato e $139,4 \pm 26,2$ mg GAE/g de extrato, para o extrato etanólico e aquoso respetivamente. No seu estudo, Carvalho (2010) também obteve os maiores teores compostos fenólicos $259,649$ mg GAE/g para o extrato metanólico de *L. lauri*. Comparando com outras espécies de cogumelos que também habitam em troncos de árvores, podemos observar que estas também apresentam compostos fenólicos, porém, em quantidades muito variáveis.

Macáková et al., (2010) investigou a atividade biológica de vários extratos etanólicos de cogumelos. O TPC observado variou entre $23,4$ e 264 mg GAE/g extrato. De todos os cogumelos

estudados, destaca-se o *Fomitopsis pinicola*, um cogumelo decompositor de troncos de árvores, com um TPC de $264 \pm 0,7$ mg GAE/g extrato. Já Ezzudin et al. (2019) verificou a atividade antioxidante de extratos aquosos e metanólicos de espécies de cogumelos. As espécies que obtiveram teores de compostos fenólicos mais altos foram o maitake (*Grifola frondosa*) ($0,12944 \pm 1,06$ mg GAE/g extrato e $0,40028 \pm 11,35$ mg GAE/g extrato, para o aquoso e metanólico, respetivamente) e o kukur (*Schizophyllum commune*) ($0,21135 \pm 11,89$ mg GAE/g extrato), para o extrato aquoso. Os compostos fenólicos possuem inúmeras atividades biológicas além da atividade antioxidante que lhe é habitualmente conferida (Dai & Mumper, 2010). Tanto a *F. pinicola*, a *S. commune* e, principalmente, a *G. frondosa* são conhecidas pelas suas várias atividades biológicas (Chandrawanshi et al., 2017; Dresch et al., 2015; Wu et al., 2021).

Relativamente aos extratos do *L. lauri* em mistura, estes apresentaram os valores mais baixos de compostos fenólicos. Contrariamente aos extratos do fungo isolado, o extrato etanólico nestes extratos obteve resultados mais elevados que o aquoso. Fazendo uma análise às plantas utilizadas, não foi possível, até à data, encontrar artigos que incidissem no teor dos compostos fenólicos nem no potencial antioxidante da *P. galioides*. Já para as restantes plantas, extratos hidroalcoólicos de *P. judaica* obtiveram teores de $0,6785$ mg GAE/g (Khaledi et al., 2018) enquanto o extrato etanólico e aquoso de *P. aviculare* na investigação de Cai et al., (2020) apresentou teores de $18,5 \pm 0,66$ mg GAE/g e $4,82 \pm 0,22$ mg GAE/g respetivamente. Hsu, (2006) no entanto, obteve teores de $677,4 \pm 62,7$ mg GAE/g do extrato etanólico de *P. aviculare*. Devido à escassez de estudos que comparem extratos aquosos e etanólicos nestas plantas, à exceção da *P. aviculare*, pode-se apenas colocar a hipótese de que os compostos fenólicos das plantas em mistura são mais solúveis em etanol do que em água, indo de encontro ao observado por Cowan, (1999). As quantidades de compostos fenólicos numa planta/fungo podem variar devido a inúmeros fatores, tais como as condições de cultivo e crescimento, a maturidade da planta/fungo, assim como o processamento e armazenamento (Nacz & Shahidi, 2006). Estes últimos fatores são especialmente importantes no trabalho, uma vez que o fungo *L. lauri* foi comprado já seco e embalado.

Em relação ao ensaio do DPPH, o extrato etanólico *L. lauri* isolado foi o que demonstrou maior ação radicalar, $IC_{50} = 18,9 \pm 2,2$ μ g/mL, seguido do extrato aquoso $IC_{50} = 69,8 \pm 5,5$ μ g/mL. Os mesmos artigos verificaram que *F. pinicola* obteve os melhores resultados em neutralizar o radical DPPH, $IC_{50} = 0,09$ mg/mL. No caso do *S. commune* e *G. frondosa*, apesar de apresentarem nos estudos elevados teores de compostos fenólicos, no ensaio de DPPH demonstraram percentagens de inibição do radical muito baixas ($38,01 \pm 0,43$ % e $13,39 \pm 1,96$ % para o extrato aquoso, respetivamente; e $15,09 \pm 1,34$ % e $25,16 \pm 2,33$ % para o extrato metanólico,

respetivamente). Os valores de inibição do radical DPPH• da *P. aviculare* encontrados por Hsu, (2006) foram de $IC_{50} = 50 \mu\text{g/mL}$.

Neste trabalho obtivemos valores de TPC mais baixos, comparativamente com os obtidos por Hsu, (2006). Essa poderá ser uma razão para a baixa atividade antioxidante do extrato etanólico de *L. lauri* em mistura ($IC_{50} = 100,5 \pm 9,8 \mu\text{g/mL}$).

Outros compostos que poderão fazer parte da composição do *L. lauri* e que têm ação antioxidante são as lactonas sesquiterpênicas, nomeadamente a costunolida (Eliza et al., 2010). Por essa razão, é normal obtermos melhores resultados em extratos do fungo isolado, uma vez que foi utilizada uma quantidade maior nos procedimentos de extração.

Por último, no ensaio da ferrozina, os melhores resultados foram obtidos com o extrato etanólico de *L. lauri* em mistura ($IC_{50} = 163,5 \pm 3,1 \mu\text{g/mL}$). Estes resultados não estão de acordo com o ensaio do DPPH nem com o TPC. Estas observações realçam a importância de incluir diferentes ensaios de *scavenging* de radicais livres, durante a avaliação do potencial antioxidante de produtos naturais (Wong et al., 2014).

Outra questão poderá ter a ver com mecanismos de sobrevivência de algumas plantas que, na falta de determinados nutrientes e minerais no substrato, evoluíram ao desenvolver estratégias que lhes permitissem sobreviver em ambientes menos favoráveis. Na presença de solos pobres em ferro, algumas plantas podem desenvolver dois tipos de estratégias: a exploração do solo, causando modificações nas suas raízes e a mobilização de formas de ferro não disponíveis e ocorre através de reações de redução, acidificação e quelação. Segundo a literatura, a *P. judaica* produz compostos fenólicos com capacidade de quelar o ferro, principalmente em ambientes com défice deste ião (Tato et al., 2013). Deste modo podemos inferir que a presença da *P. judaica*, poderá ser a responsável por este resultado, uma vez que os extratos que apresentaram menor capacidade de quelar o ferro referem-se ao fungo isolado.

4.2. Atividade anti-inflamatória dos extratos de *L. lauri*

Vários estudos têm sugerido que algumas espécies de cogumelos podem exibir potencial anti-inflamatório baseado na sua capacidade para reduzir a produção de mediadores da inflamação (Azab et al., 2019; Taofiq et al., 2015).

A reação inflamatória, tipicamente caracterizada por vermelhidão, inchaço, calor e dor é um dos mais importantes mecanismos de defesa contra agentes patogénicos invasores. Porém, uma inflamação persistente pode resultar em dano dos tecidos e possível falência de órgãos vitais (George et al., 2014). Após um certo tempo, a inflamação associada ao trauma, predisposição genética, stress ou idade pode causar danos às células, e libertar vários componentes das membranas que vão ativar o processo inflamatório. Os fosfolípidos libertados da membrana

podem ser convertidos em ácido araquidônico pela enzima fosfolipase 2. O ácido araquidônico é benéfico quando produzido de forma moderada; porém em casos de inflamação severa é produzido em excesso, sendo convertido pelas vias da COX e LOX em substâncias inflamatórias potentes como as prostaglandinas e os leucotrienos, respectivamente (Oestvang & Johansen, 2006).

Os leucotrienos têm um importante papel no processo inflamatório. Estes compostos são sintetizados pela via da LOX com a ajuda da enzima 5-LOX. O presente estudo demonstrou que apenas os extratos de *L. lauri* isolado (aquoso e etanólico) parecem inibir a enzima. Uma explicação para estes resultados pode estar relacionada pela presença do maior TPC nestes extratos (relativamente aos extratos em mistura). Sabe-se que compostos fenólicos, como os flavonóides podem interromper a geração oxidativa de ácido araquidônico a partir dos fosfolípidos, e desta forma, reduzir a produção de metabolitos inflamatórios resultantes do seu metabolismo, reduzir o dano oxidativo e reduzir a indução de vias inflamatórias, face à elevada atividade destes compostos (Messina et al., 2009). De acordo com um estudo de (Kim et al., 2008) observou-se que uma grande variedade de flavonóides parece modular as atividades das enzimas que metabolizam o ácido araquidônico, como a COX e a 5-LOX.

As catequinas pertencem ao grupo dos flavonóides também conhecidos como flavan-3-óis (ou flavanóis) e estão naturalmente presentes no chá verde, vinho tinto, morangos, uvas e pêsegos. No entanto, podem também ser encontradas em fungos, como é o caso do *L. lauri*. As principais atividades associadas às catequinas parecem ser a atividade quimiopreventiva, antioxidante e anti-inflamatória (Musial et al., 2020). Sabe-se ainda que algumas catequinas (ex: procianidinas B₂ e a catequina) têm um efeito inibitório sinérgico superior ao efeito inibitório decorrente do uso individual da acrilamida. A acrilamida é um agente carcinogénico e tóxico que causa dano oxidativo e inflamação sistémica (Zhao et al., 2019).

Outros compostos que poderão estar presentes no *L. lauri*, face a estudos de caracterização já efetuados por outros autores, são a costunolida e o dehidrocostus, que são lactonas sesquiterpénicas encontradas em produtos naturais, como plantas e fungos, e que apresentam um largo espectro de ação, incluindo efeitos anticancerígenos e anti-inflamatórios (Hsu et al., 2009; Wang et al., 2016). Estes compostos são capazes de inibir o óxido nítrico sintase e a ativação da NF-κB (Coricello et al., 2020; Matsuda et al., 2000; Wiart, 2006). A investigação de Matsuda et al., (2000) também verificou a importância da presença da fração α-MGBL na ação anti-inflamatória desta moléculas. Alguns estudos têm demonstrado que esta fração é responsável pela indução da enzima heme-oxigenase-1 (HO-1) assim como a atividade da Nrf-2 (Pae et al., 2007). A HO-1 apresentou redução de vários processos inflamatórios como a migração e adesão de leucócitos

(Freitas et al., 2006; Vicente et al., 2003) e a produção de citocinas pró-inflamatórias (Lee et al., 2003).

A reticulina, presente no *L. lauri* segundo outros autores, também apresenta atividade anti-inflamatória, estando envolvida da inibição do edema, sugerindo a inibição da via de síntese da COX; e migração de neutrófilos, sugerindo a inibição da LOX (de Alcântara et al., 2021). Yang et al., (2018) também demonstrou que este alcalóide poderá estar envolvido com as vias de sinalização da NF-κB.

Relativamente à ação anti-inflamatória dos extratos testados através da inibição da LOX, podemos verificar que apenas os extratos de *L. lauri* isolados é que apresentaram atividade e esta foi dependente da concentração (maior atividade anti-inflamatória verificada para a concentração mais alta). A maior percentagem de inibição foi encontrada no extrato aquoso (68,9% - 500 µg/mL), enquanto o extrato etanólico apenas apresentou 58,2% de inibição para a mesma concentração. O trabalho realizado por Hoobler et al., (2013) em extratos etanólicos do fungo *Geastrum fimbriatum*, utilizando o mesmo método, obteve percentagem de inibição de 12,92% (para a concentração de 100 µg/mL). A percentagem do solvente não foi especificada, contudo pode ter influenciado o seu resultado, uma vez que estudos em espécies do género *Geastrum* apresentaram ação anti-inflamatória promissora.

Uma vez que os extratos etanólicos são mais eficientes na extração de compostos fenólicos e de lactonas sesquiterpénicas, seria de esperar que estes apresentassem a maior percentagem de inibição. Contudo, tal não se verifica e existem alguns fatores que podem ter interferido com os resultados. O etanol pode reduzir a atividade da enzima inibidora do ensaio, o que poderá ter influenciado o resultado obtido (*5-lipoxygenase assay kit (catalog no. KA1329, Version 10) – Abnova*). De salientar que, apesar do extrato etanólico não ter apresentado a percentagem de inibição mais alta, foi o único extrato que apresentou atividade em todas as concentrações. Além disso, o extrato aquoso também apresentou um valor relativamente alto de TPC que poderão ser responsáveis pela atividade anti-inflamatória registada. Por último, esta atividade poderá estar relacionada com à presença do alcalóide reticulina, que pode interferir com a vias de síntese da lipoxigenase.

Estes resultados sugerem que a atividade anti-inflamatória parece estar relacionada com a presença do *L. lauri*, uma vez que não se verificou nenhuma atividade dos extratos em mistura. Mais uma vez, a baixa concentração de fungo ou alguma interação entre compostos na mistura, poderá ter afetado a deteção da atividade anti-inflamatória.

4.3. Atividade antibacteriana dos extratos de *L. lauri*

Os compostos antibacterianos podem atuar em diferentes alvos na bactéria, incluindo na parede celular, membrana plasmática, síntese proteica e metabolismo de ácidos nucleicos. Entre estes compostos, é de realçar os compostos fenólicos que exibem uma grande diversidade estrutural, como a presença de grupos hidroxilo e grupos substituintes, que conferem atividade antibacteriana, permitindo uma eficácia seletiva contra bactérias resistentes a diferentes antibióticos (Martelli & Giacomini, 2018).

As lactonas sesquiterpénicas por sua vez, também são extensamente estudadas pela sua atividade antibacteriana. Inicialmente, Kalsi et al., (1977) estabeleceu uma correlação entre a presença do anel α -MGBL e a atividade antibacteriana. Estudos de outros autores demonstraram que esta atividade não era devida apenas à presença do anel, mas também a configurações e arranjos espaciais das moléculas (Macías et al., 1999) e às suas características lipofílicas (Cantrell et al., 1998). Segundo Morais, (1987), as lactonas sesquiterpénicas, nomeadamente a costunolida e a dehidrocostus, são os principais constituintes ativos do *L. lauri*. Estes compostos também foram identificados no fungo na dissertação de Carvalho, (2010). Vários estudos demonstraram a atividade antibacteriana destas duas lactonas sesquiterpénicas (Deyno et al., 2021; Lee et al., 2014; Park et al., 1997; Sun et al., 2003). Luna-Herrera et al., (2007) também verificou que amostras das lactonas isoladas apresentavam menos atividade do que amostras que continham as duas lactonas na sua composição. Por fim, Serina et al., (2016) também identificaram proantocianidinas do tipo A no *L. lauri* que são compostos conhecidos por possuírem atividade antibacteriana (Mayer et al., 2008).

Neste trabalho, os extratos foram testados através do ensaio de difusão em disco. Nenhuma das amostras demonstrou inibição do crescimento da *E. coli*, o que é congruente com os estudos em lactonas sesquiterpénicas (compostos que, segundo a literatura, existem no *L. lauri*) que demonstram uma maior atividade para inibição do crescimento de bactérias Gram (+) do que Gram (-) (Deyno et al., 2021; Sun et al., 2003). As baterias Gram (-), como a *E. coli*, são menos suscetíveis do que bactérias Gram (+) devido à presença de uma estrutura da sua parede celular que possui a capacidade de reduzir a permeabilidade da sua parede externa a determinados compostos (Martinez et al., 2001).

No estudo efetuado e no ensaio da microdiluição com *S. aureus*, verificaram-se melhores valores de MIC para o extrato etanólico de *L. lauri* isolado. No casos das plantas utilizadas em mistura, os estudos existentes referem essencialmente a sua ação (de forma isolada) e em bactérias Gram (-). Porém, os métodos extrativos e partes utilizadas das plantas utilizadas nos estudo também diferem.

Por exemplo, estudos desenvolvidos por Abdallah & Omar, (2019) indicaram que extratos etanólicos de *P. judaica* apresentaram inibição em estirpes de *E. coli* multirresistentes (MIC = 6,25 mg/mL). Contudo, o método de extração difere do utilizado neste estudo, uma vez que a quantidade de planta utilizada foi superior e o processo de maceração, com etanol a 70% em vez de 55%, e durou uma semana com agitações programadas. O tempo de contato com o solvente, a percentagem do mesmo e a quantidade de material vegetal disponível podem influenciar a extração dos compostos e poderão explicar a ausência de resultados positivos. Por sua vez, também a *P. aviculare* apresentou atividade antibacteriana em Gram (-) na investigação levada a cabo por Salama & Marraiki, (2010), mas os métodos de extração também foram diferentes, tendo os autores utilizado uma razão amostra/solvente diferente. A percentagem do solvente não foi especificada. Além disso, os autores verificaram diferenças na atividade antibacteriana consoante o órgão da planta utilizado, sendo a atividade superior nos extratos provenientes das hastes do que nos extratos provenientes das folhas. A planta que se utilizou na mistura com *L. lauri* não especificava a parte presente, aparentando ter hastes e folhas. Por último, a *P. galioides*, (planta utilizada na mistura de *L. lauri*) também demonstrou atividade antibacteriana (Neto et al., 2002), porém os métodos extrativos utilizados no estudo também foram diferentes dos nossos.

Outra questão que poderá influenciar os resultados está relacionada com a altura em que o material vegetal/fungo é colhido. Por exemplo, estudos realizados por Ramos & Moreira, (2019) acerca da composição do óleo essencial da *P. galioides* concluíram que existe uma variação sazonal da sua composição, obtendo extratos mais ricos em monoterpenos no verão e extratos mais ricos em sesquiterpenos nas restantes estações. A maturidade do órgão da planta utilizado também poderá influenciar a sua composição, como demonstrado por (Rodilla et al., 2008) que verificou que o óleo essencial dos frutos de *L. novocanariensis* apresentavam diferenças na quantidade de monoterpenos dependendo se eram utilizados maduros ou não. Esta questão poderá ter influência no trabalho pois não se sabe em que fase de maturação o *L. lauri* foi colhido.

Os extratos aquosos não demonstraram atividade antibacteriana, apesar de um dos extratos apresentar TPC relativamente alto. Esta questão poderá ser explicada pela natureza dos metabolitos com esta atividade biológica, que poderão ser mais solúveis em etanol do que em água, como é o caso das lactonas sesquiterpénicas (Brás et al., 2020) e de alguns polifenóis (Sineiro et al., 2008), nomeadamente alguns flavonóides (Liu et al., 2022). De acordo com um estudo de Cowan (1999) a utilização de solventes como o etanol e a acetona são altamente eficientes na extração de compostos fenólicos. Num outro estudo, Mehmood et al., (2018) observaram que os compostos com maior atividade antimicrobiana foram extraídos com etanol e metanol. O maior potencial antimicrobiano do extratos metanólicos está associado à sua elevada polaridade, permitindo a extração dos compostos fenólicos (Mehmood et al., 2018). Entre os

diversos mecanismos de ação dos flavonóides destacam-se a sua capacidade de inibição da produção da síntese de ácidos nucleicos, a capacidade de inibição da função da membrana citoplasmática e a inibição do metabolismo energético (Cushnie & Lamb, 2005).

Além disso, a polaridade de compostos vegetais podem influenciar a extensão da difusão – compostos menos polares difundem mais lentamente no meio de cultura, o que torna este método menos adequado quando estamos a fazer *screening* da atividade (Mann & Markham, 1998; Moreno et al., 2006).

O *S. aureus* demonstrou suscetibilidade aos extratos etanólicos nas concentrações de 5 mg/mL e de 10 mg/mL para o fungo isolado (4,3 e 16, 3 mm respetivamente) e para o fungo em mistura na concentração de 10 mg/mL (12 mm). Estes resultados estão de acordo com os estudos acima mencionados que também demonstraram maior susceptibilidade em estirpes de *S. Aureus* (Abdallah & Omar, 2019; Deyno et al., 2021; Neto et al., 2002; Salama & Marraiki, 2010; Sun et al., 2003).

Após a avaliação da atividade antibacteriana procedemos à determinação do MIC dos extratos com o ensaio da microdiluição apenas para o *S. aureus*. O único estudo que incide sobre a atividade antibacteriana em extratos alcoólicos de *L. lauri* refere um MIC de 0,0625 mg/mL em estirpes de *S. aureus* (Serina et al., 2016). Este valor está de acordo com os resultados obtidos (0,078125 mg/mL). A diferença entre o extrato etanólico de fungo isolado e do fungo em mistura, que obteve um MIC de 0,15625 mg /mL, poderá ser devida também à menor porção de *L. lauri* que é utilizada na mistura, diminuindo a concentração de compostos ativos no extrato. O ensaio da resazurina permitiu observar, de forma clara, a existência de atividade bacteriana, uma vez que células ativas reduzem a resazurina (azul) em resorufina (cor-de rosa) (Elshikh et al., 2016).

4.4. Atividade Citotóxica

Devido a alterações ambientais e no estilo de vida da população, o cancro do pulmão tem sido uma das principais causas de mortes por cancro, ao longo dos anos. De acordo com dados de 2018 do Global Cancer Observatory (GLOBOCAN), o cancro do pulmão é o cancro mais frequente, contando com 11,6% dos 18,1 milhões de novos casos de cancro diagnosticados (Bray et al., 2018).

De acordo com as diferentes características morfológicas, o cancro do pulmão classifica-se em cancro de pulmão de pequenas células (representando 15% dos pacientes com cancro do pulmão) e cancro do pulmão de não pequenas células (contabilizando 85% dos pacientes). O cancro do pulmão de não pequenas células inclui diferentes subtipos, como o adenocarcinoma, carcinomas pavimentosos e carcinoma de grandes células (Guo et al., 2021). Para além da pesquisa que tem sido feita no diagnóstico e tratamento do cancro do pulmão (que inclui quimioterapia, radioterapia e imunoterapia), a taxa de sobrevivência a 5 anos é muito reduzida. Desta forma, o desenvolvimento de novos agentes, com menos efeitos adversos e menor toxicidade é crucial.

Um modelo celular comumente utilizado é a linhagem celular de carcinoma de pulmão (A549), isolada em 1973, de um adenocarcinoma pulmonar (Lieber et al., 1976), tem sido um dos pilares da pesquisa a nível respiratório, ao longo destas últimas décadas (Hadifar et al., 2021; Yu et al., 2011).

Os ensaios de citotoxicidade recorrendo a culturas de células *in vitro* constituem uma importante ferramenta na descoberta de potenciais novos agentes anticancerígenos a partir de produtos naturais (Chicca et al., 2008). O ensaio do MTT é um ensaio colorimétrico sensível e confiável que usa medições quantitativas para estimar a viabilidade celular. Este método é muito utilizado para a pesquisa de agentes anticancerígenos (Petty et al., 1995).

Muitos metabolitos provenientes de fungos têm demonstrado propriedades anticancerígenas promissoras, tanto em estudos *in vitro*, como em modelos animais. Alguns análogos sintéticos desses metabolitos têm sido utilizados em ensaios clínicos. No entanto, atualmente, ainda não existem agentes derivados de fungos aprovados como fármacos anticancerígenos. Tal facto pode ser devido ao desconhecimento dos mecanismos de ação e à insuficiente informação para apoiar os estudos pré-clínicos e clínicos (Yuan et al., 2020).

As guidelines do *American National Cancer Institute* (NCI) consideram um extrato potencialmente interessante para pesquisas anticancerígenas, quando o IC₅₀ para inibição do crescimento se situa abaixo dos 30 µg/ml, após períodos de incubação de 48 e 72h, enquanto para compostos puros estabelece um valor inferior a 4 µg/ml (Boik, 2001; Hameed, 2012). Neste trabalho utilizamos os mesmos valores do NCI para a discussão dos valores de IC₅₀ encontrados para os extratos de fungo isolado e mistura de fungo e plantas.

Dos extratos estudados, apenas no extrato aquoso do *L. lauri* em mistura não foi possível obter um valor de IC₅₀. Nos restantes extratos, o que apresentou resultados mais promissores (próximo dos 30 µg/mL) foi o extrato etanólico de *L. lauri* em mistura, com um valor de IC₅₀ de 48,3 ± 1,0 µg/mL, às 48h, seguido do extrato etanólico de *L. lauri* isolado (IC₅₀ = 72,1 ± 4,3 µg/mL, às 48h). Na literatura não existem estudos que avaliem a citotoxicidade do *L. lauri*, no entanto é possível encontrar estudos com outros fungos que também parasitam plantas e até com compostos que parecem estar presentes na espécie estudada neste trabalho.

Por exemplo, num estudo realizado por Wang et al., (2010) foram identificados 11 fungos endófitos provenientes de *Datura stramonium*. A viabilidade celular variou de 92,2 a 146,9%, refletindo um efeito inibitório praticamente inexistente por parte de extratos brutos de fungos, durante o período de incubação de 96h. A viabilidade celular acima dos 100% foi observada principalmente para as maiores concentrações de extratos de fungos (25, 50 e 100 µg/mL), o que pode ter resultados do potencial antioxidante dos compostos nos extratos (Wang et al., 2010).

Em relação aos compostos que parecem estar presentes no *L. lauri*, temos os compostos costunolida e o dehidrocostus, lactonas sesquiterpénicas, presentes em plantas medicinais como o *Laurus nobilis*, que o fungo *L. lauri* pode parasitar. Face ao elevado interesse no estudo destes dois compostos, sabe-se que parecem ter um bom efeito terapêutico contra uma grande variedade de cancros. Mais uma vez, a presença do anel α -MGBL parece ser essencial na ação citotóxica destas lactonas sesquiterpénicas (Sun et al., 2003). Particularmente, nos estudos *in vitro*, a costunolida e o dehidrocostus exibem uma elevada seletividade e marcada citotoxicidade contra o cancro da mama, leucemia, entre outros (Li et al., 2020).

O composto costunolida tem vindo a ser estudado devido ao seu potencial anticancerígeno em vários tipos de cancro, como leucemias (Butturini et al., 2011) cancro do fígado (Liu et al., 2011) cancro da mama (Pitchai et al., 2014), cancro da bexiga (Rasul et al., 2013) e cancro do pulmão (Hua et al., 2016). Alguns autores têm reportado efeitos citotóxicos em compostos relacionados com a costunolida como a isodihidrocostunolida, dihidrocostunolida, derivados metoxi da costunolida e β -ciclocostunolida em diferentes linhagens celulares do cólon (Colo-205), da mama (MCF-7) e pulmão (A549) (Robinson et al., 2008). Parecem ser vários os potenciais mecanismos de ação associados à costunolida, como a indução da apoptose e diferenciação, a promoção da agregação de proteínas dos microtúbulos, a inibição da atividade da telomerase, a inibição da metastização, entre outros (Lin et al., 2015). Num outro estudo, Wang, Zhao & Gong (2016) demonstraram que o composto costunolida exibiu atividade citotóxica por indução da apoptose através da via das caspases dependente da mitocôndria, mediada pelo stress do reticulo endoplasmático induzido por ROS (Wang et al., 2016). No entanto, os mecanismos moleculares pelos quais atuam não estão ainda totalmente esclarecidos (Li et al., 2020).

Como referido anteriormente o extrato com melhor IC_{50} foi o extrato etanólico de *L. lauri* em mistura. Estes valores podem ser explicados pela ação citotóxica das plantas na mistura e dos seus compostos. No seu trabalho, Qadi et al., (2020) avaliou algumas atividades biológicas da *P. judaica* (rica em procianidinas), entre elas a citotóxica. Os resultados demonstraram que as frações de hexano e acetona da planta diminuíram a viabilidade celular de células do cancro do cólon do útero (HeLa) de modo significativo ($p < 0,0001$) em aproximadamente 90% na concentração de 0,625 mg/mL (Qadi et al., 2020).

No caso da planta sempre noiva (*P. aviculare*) também alguns estudos têm demonstrado a sua citotoxicidade. Por exemplo, Habibi et al., (2011) demonstraram que a planta induziu citotoxicidade em células de cancro da mama (MCF-7) nas concentrações superiores a 300 ng/mL. De realçar que os fitoquímicos obtidos de plantas da família *Polygonoidae* podem atuar em células cancerígenas resistentes e aumentar a eficácia de alguns fármacos citostáticos. Jovanović et al., (2021) estudou as propriedades citotóxicas de extratos etanólicos obtidos de *P. aviculare* e *P.*

amphibia, individualmente e em combinação com doxorrubicina em células de carcinoma hepático (HepG2). Neste caso, observou-se um sinergismo em termos de citotoxicidade para os extratos combinados com o fármaco (Jovanović et al., 2021).

5. Conclusão

Desde tempos ancestrais, que os seres humanos utilizam os vários recursos que a natureza oferece para o tratamento de inúmeras patologias. No entanto, apenas uma pequena percentagem das plantas e fungos existentes tem sido devidamente estudada e documentada pelas suas atividades medicinais. Através de estudos etnofarmacológicos conseguimos identificar os usos atribuídos ao *L. lauri* na ilha da Madeira, mas ainda muito pouco se sabe acerca deste fungo. Desta forma, o objetivo do trabalho consistiu em avaliar potenciais atividades biológicas, nomeadamente a antioxidante, anti-inflamatória, antibacteriana e citotóxica do *L. lauri* isolado e do *L. lauri* em mistura.

Com base nos resultados, podemos afirmar que de uma maneira global, os extratos etanólicos apresentaram melhores resultados, realçando a importância do tipo de solvente utilizado e indo de encontro com o encontrado na literatura e ao seu uso tradicional.

As amostras demonstraram possuir atividade antioxidante para os extratos etanólicos, tanto do fungo isolado, como para o fungo em mistura, evidenciando diferentes mecanismos antioxidantes conforme a inclusão ou não das plantas.

Os extratos etanólicos foram os que apresentaram atividade antibacteriana em estirpes de *S. aureus*, com o fungo isolado a apresentar melhores resultados, o que é corroborado pela literatura existente.

Em termos de atividade citotóxica, o extrato etanólico de *L. lauri* em mistura foi o que apresentou melhor valor de IC₅₀, comprovando a atividade citotóxica nos constituintes do fungo, nomeadamente as lactonas sesquiterpénicas costunolida e dehidrocostus, como das plantas utilizadas em mistura.

O ensaio da inibição 5-LOX demonstrou que apenas extratos com *L. lauri* isolado apresentam atividade anti-inflamatória. Contrariamente aos restantes ensaios, o extrato aquoso foi o que obteve maior percentagem de inibição da 5-LOX na concentração mais alta, contudo, os extratos etanólicos apresentaram inibição em todas as concentrações testadas.

A realização de estudos como este que foi realizado, demonstram a importância tanto da existência de estudos etnofarmacológicos, principalmente em zonas onde ainda existe flora e variedades de cogumelos pouco estudados, como dos ensaios *in vitro* que nos permitem identificar e avaliar o seu potencial biológico.

Tendo em conta os resultados obtidos, o *L. lauri* apresenta atividades biológicas promissoras, contudo como perspectivas futuras, referimos a necessidade de estudos que identifiquem e quantifiquem os compostos presentes no fungo, assim como estudos que relacionem de forma clara que compostos estão envolvidos nas atividades biológicas identificadas. Para as plantas utilizadas no estudo poderá ser interessante realizar os mesmos ensaios em cada uma das plantas isoladamente e comparar com as misturas.

A compreensão da composição do fungo e a possível identificação de novos compostos poderá funcionar como um catalisador para novos estudos e para a descoberta de novas atividades biológicas. Além disso, seria interessante a realização de estudos com o fungo colhido fresco e em diferentes fases de maturação, de modo a identificar possíveis diferenças em termos de atividades biológicas, assim como na variação da sua composição. De forma a analisar mais informações descritas nos estudos etnofarmacológicos, poderia ser interessante replicar o processo de preparação, utilizando aguardente “de borra ou de vinho” e deixar fermentar durante 8 dias, como indicado, e realizar uma pesquisa acerca das atividades biológicas e verificar se existem diferenças ao nível das atividades biológicas.

Como limitações destacam-se a escassez de estudos com o fungo *L. lauri*, o que dificultou a discussão e a comparação dos resultados com outros autores. O uso de apenas dois ensaios antioxidantes também limitou a discussão, tendo em conta que as plantas e os fungos contêm muitos compostos ativos e que podem atuar por mecanismos diferentes. Desta forma, é recomendado também alargar o leque de ensaios antioxidantes (incluindo outros como o FRAP, ABTS, entre outros).

6. Referências Bibliográficas

- Abdallah, L., & Omar, G. (2019). Antibacterial effect of some wild medicinal plants in Palestine against multidrug resistant *Escherichia coli* clinical isolate. *Brazilian Journal of Biological Sciences*, *6*(12), 103–113. <https://doi.org/10.21472/bjbs.061209>
- Abel-Fernandez, E., Fernandez-Caldas, E., Cases, B., Tudela, J., Ferrer, A., Guardia, P., Casanovas, M., & Subiza, J. (2012). Allergenic potency of *Parietaria judaica* and *Olea europaea* using different serum pools containing, or not, specific IgE to the major allergens. *Allergy*, *67*, 540.
- Aboel-Atta, A. I. (2009). On the taxonomy of *Laurus L.* (Lauraceae), evidence from isozymes, RAPD and ISSR. *Academic Journal of Plant Sciences*, *2*(2), 82–91.
- Akki, R., Raghay, K., & Errami, M. (2021). Potentiality of ghrelin as antioxidant and protective agent. In *Redox Report* (Vol. 26, Issue 1, pp. 71–79). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/13510002.2021.1913374>
- Alejo-Armijo, A., Altarejos, J., & Salido, S. (2017). Phytochemicals and Biological Activities of Laurel Tree (*Laurus nobilis*). *Natural Product Communications*, *12*(5), 743–757.
- Alessi, N., Wellstein, C., Spada, F., & Zerbe, S. (2018). Phytocoenological approach to the ecology of *Laurus nobilis L.* in Italy. *Rendiconti Lincei*, *29*(2), 343–354. <https://doi.org/10.1007/s12210-018-0677-8>
- Ali, S. S., Ahsan, H., Zia, M. K., Siddiqui, T., & Khan, F. H. (2020). Understanding oxidants and antioxidants: Classical team with new players. In *Journal of Food Biochemistry* (Vol. 44, Issue 3). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13145>
- Alimi, D., Hajri, A., Jallouli, S., & Sebai, H. (2021). In vitro acaricidal activity of essential oil and crude extracts of *Laurus nobilis*, (Lauraceae) grown in Tunisia, against arthropod ectoparasites of livestock and poultry: *Hyalomma scupense* and *Dermanyssus gallinae*. *Veterinary Parasitology*, *298*. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2021.109507>
- Ali-Shtayeh, M. S., Yaniv, Z., & Mahajna, J. (2000). Ethnobotanical survey in the Palestinian area: a classification of the healing potential of medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, *73*(1–2), 221–232.
- Al-Kalaldeh, J. Z., Abu-Dahab, R., & Afifi, F. U. (2010). Volatile oil composition and antiproliferative activity of *Laurus nobilis*, *Origanum syriacum*, *Origanum vulgare*, and *Salvia triloba* against human breast adenocarcinoma cells. *Nutrition Research*, *30*(4), 271–278.
- Ambriz-Pérez, D. L., Leyva-López, N., Gutierrez-Grijalva, E. P., & Heredia, J. B. (2016). Phenolic compounds: Natural alternative in inflammation treatment. A Review. *Cogent Food & Agriculture*, *2*(1), 1131412.

- Angelova, P. R., Esteras, N., & Abramov, A. Y. (2021). Mitochondria and lipid peroxidation in the mechanism of neurodegeneration: Finding ways for prevention. In *Medicinal Research Reviews* (Vol. 41, Issue 2, pp. 770–784). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/med.21712>
- Anzano, A., de Falco, B., Grauso, L., Motti, R., & Lanzotti, V. (2022). Laurel, *Laurus nobilis* L.: a review of its botany, traditional uses, phytochemistry and pharmacology. In *Phytochemistry Reviews* (Vol. 21, Issue 2, pp. 565–615). Springer Science and Business Media B.V. <https://doi.org/10.1007/s11101-021-09791-z>
- Aponte, J. C., Vaisberg, A. J., Rojas, R., Sauvain, M., Lewis, W. H., Lamas, G., Sarasara, C., Gilman, R. H., & Hammond, G. B. (2009). A multipronged approach to the study of Peruvian ethnomedicinal plants: a legacy of the ICBG–Peru Project. *Journal of Natural Products*, 72(3), 524–526.
- Arroyo-García, R., Martínez-Zapater, J. M., Prieto, J. A. F., & Alvarez-Arbesú, R. (2001). AFLP evaluation of genetic similarity among laurel populations (*Laurus* L.). In *Euphytica* (Vol. 122).
- Aslam, B., Wang, W., Arshad, M. I., Khurshid, M., Muzammil, S., Rasool, M. H., Nisar, M. A., Alvi, R. F., Aslam, M. A., Qamar, M. U., Salamat, M. K. F., & Baloch, Z. (2018). Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. In *Infection and Drug Resistance* (Vol. 11, pp. 1645–1658). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/IDR.S173867>
- Attard, E., & Pacioni, P. (2011). The phytochemical and in vitro pharmacological testing of Maltese medicinal plants. *Bioactive Compounds in Phytomedicine*, 14(3), 93–112.
- Aurori, A. C., Bobiş, O., Dezmirean, D. S., Mărghitaş, L. A., & Erler, S. (2016). Bay laurel (*Laurus nobilis*) as potential antiviral treatment in naturally BQCV infected honeybees. *Virus Research*, 222, 29–33.
- Bank, W. (2017). *Drug-resistant infections: a threat to our economic future*. World Bank.
- Barbosa-Filho, J., da-Cunha, E. V. L., & Gray, A. I. (2000). *Alkaloids of the Menispermaceae*.
- Barla, A., Topçu, G., Öksüz, S., Tümen, G., & Kingston, D. G. I. (2007). Identification of cytotoxic sesquiterpenes from *Laurus nobilis* L. *Food Chemistry*, 104(4), 1478–1484. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.02.019>
- Barrero, A. F., Oltra, J. E., Álvarez, M., Raslan, D. S., Saúde, D. A., & Akssira, M. (2000). New sources and antifungal activity of sesquiterpene lactones. *Fitoterapia*, 71(1), 60–64.
- Barrios, F. J. (2018). Chemistry of sesquiterpene lactones. In *Sesquiterpene Lactones: Advances in their Chemistry and Biological Aspects* (pp. 93–117). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-78274-4_5
- Basak, S. S., & Candan, F. (2013). Effect of *Laurus nobilis* L. essential oil and its main components on α -glucosidase and reactive oxygen species scavenging activity. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 12(2), 367.

- Begn , M. G., Yslas, N., Reyes, E., Quiroz, V., Santana, J., & Jimenez, G. (2001). Clinical effect of a Mexican sanguinaria extract (*Polygonum aviculare* L.) on gingivitis. *Journal of Ethnopharmacology*, *74*(1), 45–51.
- Beierkuhnlein, C., Walentowitz, A., & Welss, W. (2021). Flocan—a revised checklist for the flora of the canary islands. *Diversity*, *13*(10). <https://doi.org/10.3390/d13100480>
- Bernabeu, E., Cagel, M., Lagomarsino, E., Moreton, M., & Chiappetta, D. A. (2017). Paclitaxel: What has been done and the challenges remain ahead. In *International Journal of Pharmaceutics* (Vol. 526, Issues 1–2, pp. 474–495). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.05.016>
- Bernstein, N., Akram, M., Daniyal, M., Koltai, H., Fridlender, M., & Gorelick, J. (2018). Antiinflammatory Potential of Medicinal Plants: A Source for Therapeutic Secondary Metabolites. In *Advances in Agronomy* (Vol. 150, pp. 131–183). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2018.02.003>
- Betzin, A., Thiv, M., & Koch, M. A. (2016). Diversity hotspots of the laurel forest on Tenerife, Canary Islands: A phylogeographic study of *Laurus* and *Ixanthus*. *Annals of Botany*, *118*(3), 495–510. <https://doi.org/10.1093/aob/mcw124>
- Blainski, A., Lopes, G. C., & de Mello, J. C. P. (2013). Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. *Molecules*, *18*(6), 6852–6865.
- Boik, John. (2001). *Natural compounds in cancer therapy*. Oregon Medical Press.
- Bolari , S., Dunki , V., Bezi , N., Kremer, D., Karlovi , K., Jelak, L., & Sre ec, S. (2019). Influence of Geographic Position, Leaf Surface and Genetic Variability on Content of Total Essential Oils in 12 Distinct Populations of Bay Laurel (*Laurus nobilis* L.). In *Agric. conspec. sci* (Vol. 84, Issue 1).
- Bonet, M.  ., & Vall s, J. (2007). Ethnobotany of Montseny biosphere reserve (Catalonia, Iberian Peninsula): Plants used in veterinary medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, *110*(1), 130–147. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.09.016>
- Bouyahya, A., Allam, A. el, Zeouk, I., Taha, D., Zengin, G., Goh, B. H., Catauro, M., Montesano, D., & Omari, N. el. (2022). Pharmacological Effects of Grifolin: Focusing on Anticancer Mechanisms. In *Molecules* (Vol. 27, Issue 1). MDPI. <https://doi.org/10.3390/molecules27010284>
- Brahmi, N., Scognamiglio, M., Pacifico, S., Mekhoukhe, A., Madani, K., Fiorentino, A., & Monaco, P. (2015). ¹H NMR based metabolic profiling of eleven Algerian aromatic plants and evaluation of their antioxidant and cytotoxic properties. *Food Research International*, *76*, 334–341.
- Br s, T., Neves, L. A., Crespo, J. G., & Duarte, M. F. (2020). Effect of extraction methodologies and solvent selection upon cynaropicrin extraction from *Cynara cardunculus* leaves. *Separation and Purification Technology*, *236*. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2019.116283>

- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *68*(6), 394–424.
- Brinza, I., Boiangiu, R. S., Hancianu, M., Cioanca, O., Erdogan Orhan, I., & Hritcu, L. (2021). Bay leaf (*Laurus nobilis* L.) incense improved scopolamine-induced amnesic rats by restoring cholinergic dysfunction and brain antioxidant status. *Antioxidants*, *10*(2), 259.
- Broadhurst, C. L., Polansky, M. M., & Anderson, R. A. (2000). Insulin-like biological activity of culinary and medicinal plant aqueous extracts in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(3), 849–852.
- Butturini, E., Cavaliere, E., de Prati, A. C., Darra, E., Rigo, A., Shoji, K., Murayama, N., Yamazaki, H., Watanabe, Y., Suzuki, H., & Mariotto, S. (2011). Two naturally occurring terpenes, dehydrocostuslactone and costunolide, decrease intracellular GSH content and inhibit STAT3 activation. *PLoS ONE*, *6*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020174>
- Butturini, E., di Paola, R., Suzuki, H., Paterniti, I., Ahmad, A., Mariotto, S., & Cuzzocrea, S. (2014). Costunolide and Dehydrocostuslactone, two natural sesquiterpene lactones, ameliorate the inflammatory process associated to experimental pleurisy in mice. *European Journal of Pharmacology*, *730*, 107–115.
- Cai, Y., Wu, L., Lin, X., Hu, X., & Wang, L. (2020). Phenolic profiles and screening of potential α -glucosidase inhibitors from *Polygonum aviculare* L. leaves using ultra-filtration combined with HPLC-ESI-qTOF-MS/MS and molecular docking analysis. *Industrial Crops and Products*, *154*. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112673>
- Calonge, F. D., & Mir-Pegueroles, C. (2015). Contribución al estudio de los hongos de las Islas Azores. *Bol. Soc. Micol. Madrid*, *39*, 231–242. <https://www.researchgate.net/publication/295907724>
- Calvo, M. I., & Caveró, R. Y. (2014). Medicinal plants used for cardiovascular diseases in Navarra and their validation from Official sources. *Journal of Ethnopharmacology*, *157*, 268–273. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.09.047>
- Camacho, M. del R., Phillipson, J. D., Croft, S. L., Rock, P., Marshall, S. J., & Schiff Jr, P. L. (2002). In vitro activity of *Triclisia patens* and some bisbenzylisoquinoline alkaloids against *Eishmania donovani* and *Trypanosoma brucei brucei*. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, *16*(5), 432–436.
- Cantrell, C. L., Nuñez, I. S., Castañeda-Acosta, J., Foroozesh, M., Fronczek, F. R., Fischer, N. H., & Franzblau, S. G. (1998). Antimycobacterial activities of dehydrocostus lactone and its oxidation products. *Journal of Natural Products*, *61*(10), 1181–1186. <https://doi.org/10.1021/np970333i>
- Cappiello, F., Loffredo, M. R., Plato, C. del, Cammarone, S., Casciaro, B., Quaglio, D., Mangoni, M. L., Botta, B., & Ghirga, F. (2020). The revaluation of plant-derived terpenes to fight antibiotic-resistant

- infections. In *Antibiotics* (Vol. 9, Issue 6, pp. 1–33). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9060325>
- Caputo, L., Nazzaro, F., Souza, L. F., Aliberti, L., de Martino, L., Fratianni, F., Coppola, R., & de Feo, V. (2017). *Laurus nobilis*: Composition of essential oil and its biological activities. *Molecules*, *22*(6), 930.
- Carvalho, M. J. M. (2010). *Caracterização e isolamento de compostos bioactivos do fungo Laurobasidium lauri (Madre de louro)*. Universidade da Madeira (Portugal)).
- Chahal, K. K., Bansal, R., & Kaur, R. (2016). Chemistry and insecticidal potential of bay leaf essential oil against stored grain pest of wheat. *Journal of Applied and Natural Science*, *8*(4), 2049–2054.
- Chandrawanshi, N. K. , Tandia, D. K. , & Jadhav, S. K. . (2017). Nutraceutical properties evaluation of *Schizophyllum commune*. *Indian Journal of Scientific Research*. <https://www.researchgate.net/publication/317954276>
- Chaturvedi, R. K., & Beal, M. F. (2013). Mitochondrial diseases of the brain. *Free Radical Biology and Medicine*, *63*, 1–29.
- Chen, H., Chou, C., Lee, S., Wang, J., & Yeh, S. (1995). Active compounds from *Saussurea lappa* Clarks that suppress hepatitis B virus surface antigen gene expression in human hepatoma cells. *Antiviral Research*, *27*(1–2), 99–109.
- Chen, H., Xie, C., Wang, H., Jin, D. Q., Li, S., Wang, M., Ren, Q., Xu, J., Ohizumi, Y., & Guo, Y. (2014). Sesquiterpenes inhibiting the microglial activation from *laurus nobilis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*(20), 4784–4788. <https://doi.org/10.1021/jf501515v>
- Chen, Q., Peng, W., & Xu, A. (2002). Apoptosis of a human non-small cell lung cancer (NSCLC) cell line, PLA-801, induced by acutiaporberine, a novel bisalkaloid derived from *Thalictrum acutifolium* (Hand.-Mazz.) Boivin. *Biochemical Pharmacology*, *63*(8), 1389–1396.
- Chicca, A., Pellati, F., Adinolfi, B., Matthias, A., Massarelli, I., Benvenuti, S., Martinotti, E., Bianucci, A. M., Bone, K., & Lehmann, R. (2008). Cytotoxic activity of polyacetylenes and polyenes isolated from roots of *Echinacea pallida*. *British Journal of Pharmacology*, *153*(5), 879–885.
- Chmit, M., Kanaan, H., Habib, J., Abbass, M., Mcheik, A., & Chokr, A. (2014). Antibacterial and antibiofilm activities of polysaccharides, essential oil, and fatty oil extracted from *Laurus nobilis* growing in Lebanon. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, *7*, S546–S552.
- Choi, J.-H., Shin, K.-M., Kim, N.-Y., Hong, J.-P., Lee, Y. S., Kim, H. J., Park, H.-J., & Lee, K.-T. (2002). Taraxinic Acid, a Hydrolysate of Sesquiterpene Lactone Glycoside from the *Taraxacum coreanum* N AKAI, Induces the Differentiation of Human Acute Promyelocytic Leukemia HL-60 Cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, *25*(11), 1446–1450.
- Choodej, S., Pudhom, K., & Mitsunaga, T. (2018). Inhibition of TNF- α -induced inflammation by sesquiterpene lactones from *Saussurea lappa* and semi-synthetic analogues. *Planta Medica*, *84*(05), 329–335.

- Choudhary, R. K., Oh, S., & Lee, J. (2011). An ethnomedicinal inventory of knotweeds of Indian Himalaya. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(10), 2095–2103. <http://www.academicjournals.org/JMPR>
- Claudino-Sales, V. (2019). Laurisilva of Madeira, Portugal. In *Coastal Research Library* (Vol. 28, pp. 243–249). Springer. https://doi.org/10.1007/978-94-024-1528-5_36
- Conforti, F., Statti, G., Uzunov, D., & Menichini, F. (2006). Comparative Chemical Composition and Antioxidant Activities of Wild and Cultivated *Laurus nobilis* L. Leaves and *Foeniculum vulgare* subsp. *piperitum* (Ucria) Coutinho Seeds. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(10), 2056–2064.
- Coricello, A., Adams, J. D., Lien, E. J., Nguyen, C., Perri, F., Williams, T. J., & Aiello, F. (2020). A walk in nature: sesquiterpene lactones as multi-target agents involved in inflammatory pathways. *Current Medicinal Chemistry*, 27(9), 1501–1514.
- Cornara, L., la Rocca, A., Marsili, S., & Mariotti, M. G. (2009). Traditional uses of plants in the Eastern Riviera (Liguria, Italy). *Journal of Ethnopharmacology*, 125(1), 16–30. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.06.021>
- Costa, J. C., Capelo, J., Jardim, R., & Sequeira, M. (2004). Catálogo florístico do Arquipélago da Madeira. *Apaisagem Vegetal Da Ilha Da Madeira. Quercetea*, 6, 187–200.
- Costantini, D. (2019). Understanding diversity in oxidative status and oxidative stress: The opportunities and challenges ahead. In *Journal of Experimental Biology* (Vol. 222, Issue 13). Company of Biologists Ltd. <https://doi.org/10.1242/jeb.194688>
- Cowan, M. M. (1999). *Plant Products as Antimicrobial Agents* (Vol. 12, Issue 4). <http://cmr.asm.org/>
- Cragg, G. M., & Pezzuto, J. M. (2016). Natural products as a vital source for the discovery of cancer chemotherapeutic and chemopreventive agents. *Medical Principles and Practice*, 25(Suppl. 2), 41–59.
- da Cunha, A. P. (2017). *Manual de plantas medicinais: bases farmacológicas e clínicas*. Dinalivro.
- da Cunha, A. P., Roque, O. R., & da Silva, A. P. (2009). *Plantas e produtos vegetais em fitoterapia* (3ª).
- da Cunha, B. R., Fonseca, L. P., & Calado, C. R. C. (2019). Antibiotic discovery: Where have we come from, where do we go? In *Antibiotics* (Vol. 8, Issue 2). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8020045>
- Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. In *Molecules* (Vol. 15, Issue 10, pp. 7313–7352). <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>
- de Alcântara, B. G. V., de Oliveira, F. P., Katchborian-Neto, A., Casoti, R., da Silva Domingos, O., Santos, M. F. C., de Oliveira, R. B., de Paula, A. C. C., Dias, D. F., & Soares, M. G. (2021). Confirmation of

- ethnopharmacological anti-inflammatory properties of *Ocotea odorifera* and determination of its main active compounds. *Journal of Ethnopharmacology*, 264, 113378.
- de Corato, U., Maccioni, O., Trupo, M., & di Sanzo, G. (2010). Use of essential oil of *Laurus nobilis* obtained by means of a supercritical carbon dioxide technique against post harvest spoilage fungi. *Crop Protection*, 29(2), 142–147.
- de Feo, V. (1992). Medicinal and magical plants in the northern Peruvian Andes. *FITOTERAPIA*, 63(5), 417–440.
- de Feo, V., Belaunde, A. J., Sandoval, J. G., Senatore, F., & Formisano, C. (2008). Antibacterial activity and composition of the essential oil of *Peperomia galioides* HBK (Piperaceae) from Peru. *Natural Product Communications*, 3(6), 1934578X0800300622.
- de la Cruz, M. G., Malpartida, S. B., Santiago, H. B., Jullian, V., & Bourdy, G. (2014). Hot and cold: medicinal plant uses in Quechua speaking communities in the high Andes (Callejón de Huaylas, Ancash, Perú). *Journal of Ethnopharmacology*, 155(2), 1093–1117.
- de Sousa, R. T., Ribeiro, H., Cruz, A., & Duque, L. (2015). *Parietaria judaica* pollen: Aerobiology and allergenicity Characterization of pollen grains from different species View project. <https://www.researchgate.net/publication/279961283>
- Deyno, S., Mtewa, A. G., Hope, D., Bazira, J., Makonnen, E., & Alele, P. E. (2021). Antibacterial Activities of *Echinops kebericho* Mesfin Tuber Extracts and Isolation of the Most Active Compound, Dehydrocostus Lactone. *Frontiers in Pharmacology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.608672>
- Dhayanithy, G., Subban, K., & Chelliah, J. (2019). Diversity and biological activities of endophytic fungi associated with *Catharanthus roseus*. *BMC Microbiology*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1386-x>
- di Domenico, M., Pinto, F., Quagliuolo, L., Contaldo, M., Settembre, G., Romano, A., Coppola, M., Ferati, K., Bexheti-Ferati, A., Sciarra, A., Nicoletti, G. F., Ferraro, G. A., & Boccellino, M. (2019). The Role of Oxidative Stress and Hormones in Controlling Obesity. In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00540>
- Dias, K. L. G., da Silva Dias, C., Barbosa-Filho, J. M., Almeida, R. N., de Azevedo Correia, N., & Medeiros, I. A. (2004). Cardiovascular effects induced by reticuline in normotensive rats. *Planta Medica*, 70(4), 328–333. <https://doi.org/10.1055/s-2004-818944>
- Dresch, P., D'Aguzzo, M. N., Rosam, K., Grienke, U., Rollinger, J. M., & Peintner, U. (2015). Fungal strain matters: colony growth and bioactivity of the European medicinal polypores *Fomes fomentarius*, *Fomitopsis pinicola* and *Piptoporus betulinus*. *AMB Express*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-014-0093-0>

- Duletić-Laušević, S., Oalđe, M., & Aradski, A. A. (2019). In vitro evaluation of antioxidant, antineurodegenerative and antidiabetic activities of *Ocimum basilicum* L., *Laurus nobilis* L. leaves and *Citrus reticulata* Blanco peel extracts. *Lekovite Sirovine*, 39, 60–68.
- Eliza, J., Daisy, P., & Ignacimuthu, S. (2010). Antioxidant activity of costunolide and eremanthin isolated from *Costus speciosus* (Koen ex. Retz) Sm. *Chemico-Biological Interactions*, 188(3), 467–472. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.08.002>
- El-Sawi, S., Ibrahim, M. E., & Ali, A. M. (2009). In vitro cytotoxic, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of leaves of *Laurus nobilis* L. grown in Egypt and its chemical composition. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, 3(1), 16–23.
- Elsayed Azab, A., A Adwas, Almokhtar, Ibrahim Elsayed, A. S., A Adwas, A., Ibrahim Elsayed, Ata Sedik, & Quwaydir, F. A. (2019). Oxidative stress and antioxidant mechanisms in human body. *Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering*, 6(1), 43–47. <https://doi.org/10.15406/jabb.2019.06.00173>
- Elshikh, M., Ahmed, S., Funston, S., Dunlop, P., McGaw, M., Marchant, R., & Banat, I. M. (2016). Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. *Biotechnology Letters*, 38(6), 1015–1019. <https://doi.org/10.1007/s10529-016-2079-2>
- EUCAST. (2021a). *EUCAST Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing – Version 9.0*.
- EUCAST. (2021b). *EUCAST reading guide for broth microdilution – Version 3.0*. https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/MIC_testing/Reading_guide_BMD_v_3.0_2021.pdf
- Everest, A., & Ozturk, E. (2005). Focusing on the ethnobotanical uses of plants in Mersin and Adana provinces (Turkey). *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 1(1), 1–6.
- Ezzudin, M., Fariza, S., Ooi, L., & Shafiqah, N. (2019). Primary and secondary antioxidant activities of nine edible mushrooms species. *Food Research*, 14–20. <http://www.myfoodresearch.com>
- Fakir, H., Korkmaz, M., & Guller, B. (2009). Medicinal plant diversity of western Mediterranean region in Turkey. *Journal of Applied Biological Sciences*, 3(2), 33–43.
- Fernandez-Andrade, C. M. M., da Rosa, M. F., Borges, F., Iwanaga, C. C., Cortez, D. A. G., Martins, C. V. B., Linde, G. A., Lobo, V. S., & Gazim, Z. C. (2016). Chemical composition and antifungal activity of essential oil and fractions extracted from the leaves of *Laurus nobilis* L. cultivated in southern Brazil. *Journal of Medicinal Plants Research*, 10(48), 865–871.
- Ferrari, B., Castilho, P., Tomi, F., Rodrigues, A. I., do Ceu Costa, M., & Casanova, J. (2005). Direct Identification and Quantitative Determination of Costunolide and Dehydrocostuslactone in the Fixed Oil of *Laurus novocanariensis* by 13 C-NMR Spectroscopy. *Phytochemical Analysis*, 16, 104–107. <https://doi.org/10.1002.pca.825>

- Fortini, P., di Marzio, P., Guarrera, P. M., & Iorizzi, M. (2016). Ethnobotanical study on the medicinal plants in the Mainarde Mountains (central-southern Apennine, Italy). *Journal of Ethnopharmacology*, *184*, 208–218. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.03.010>
- Fossati, E., Narcross, L., Ekins, A., Falguyret, J.-P., & Martin, V. J. J. (2015). Synthesis of morphinan alkaloids in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One*, *10*(4), e0124459.
- Foti, M. C. (2015). Use and Abuse of the DPPH• Radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*(40), 8765–8776.
- Freitas, A., Alves-Filho, J. C., Secco, D. D., Neto, A. F., Ferreira, S. H., Barja-Fidalgo, C., & Cunha, F. Q. (2006). Heme oxygenase/carbon monoxide-biliverdin pathway down regulates neutrophil rolling, adhesion and migration in acute inflammation. *British Journal of Pharmacology*, *149*(4), 345–354.
- Freitas, F., & Mateus, M. (2013). *Plantas e Seus Usos Tradicionais. Freguesia da Fajã da Ovelha* (Serviço do Parque Natural da Madeira, Ed.).
- Friedman, M. (2016). Mushroom polysaccharides: chemistry and antiobesity, antidiabetes, anticancer, and antibiotic properties in cells, rodents, and humans. *Foods*, *5*(4), 80.
- Furtado, R., Baptista, J., Lima, E., Paiva, L., Barroso, J. G., Rosa, J. S., & Oliveira, L. (2014). Chemical composition and biological activities of *Laurus* essential oils from different Macaronesian Islands. *Biochemical Systematics and Ecology*, *55*, 333–341. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2014.04.004>
- Galigniana, N. M., Charó, N. L., Uranga, R., Cabanillas, A. M., & Piwien-Pilipuk, G. (2020). Oxidative stress induces transcription of telomeric repeat-containing RNA (TERRA) by engaging PKA signaling and cytoskeleton dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, *1867*(4), 118643.
- Gan, R.-Y., Kuang, L., Xu, X.-R., Zhang, Y., Xia, E.-Q., Song, F.-L., & Li, H.-B. (2010). Screening of natural antioxidants from traditional Chinese medicinal plants associated with treatment of rheumatic disease. *Molecules*, *15*(9), 5988–5997.
- George, A., Chinnappan, S., Chintamaneni, M., Kotak C, V., Choudhary, Y., Kueper, T., & Radhakrishnan, A. K. (2014). Anti-inflammatory effects of *Polygonum minus* (Huds) extract (Lineminus™) in in-vitro enzyme assays and carrageenan induced paw edema. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *14*(1). <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-355>
- Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., & Kempson, I. (2021). The MTT assay: utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(23), 12827.
- Ghosh, S., Bornman, C., & Zafer, M. M. (2021). Antimicrobial Resistance Threats in the emerging COVID-19 pandemic: Where do we stand? In *Journal of Infection and Public Health* (Vol. 14, Issue 5, pp. 555–560). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.02.011>

- Giachetti, A., Giraldo, E., Ladinsky, H., & Montagna, E. (1986). Binding and functional profiles of the selective M1 muscarinic receptor antagonists trihexyphenidyl and dicyclomine. *British Journal of Pharmacology*, *89*(1), 83–90.
- Gilbert, N. C., Gerstmeier, J., Schexnaydre, E. E., Börner, F., Garscha, U., Neau, D. B., Werz, O., & Newcomer, M. E. (2020). Structural and mechanistic insights into 5-lipoxygenase inhibition by natural products. *Nature Chemical Biology*, *16*(7), 783–790. <https://doi.org/10.1038/s41589-020-0544-7>
- Gorlenko, C. L., Kiselev, H. Y., Budanova, E. v., Zamyatnin, A. A., & Ikryannikova, L. N. (2020). Plant secondary metabolites in the battle of drugs and drug-resistant bacteria: New heroes or worse clones of antibiotics? *Antibiotics*, *9*(4). <https://doi.org/10.3390/antibiotics9040170>
- Gradstein, S. R., & Uribe, J. (2016). *Marchantophyta (Hepáticas)*. En; R. Bernal, SR Gradstein & M. Celis (Eds.). *Catálogo de plantas y líquenes de Colombia*. Bogotá: Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia.
- Granica, S., Czerwińska, M. E., Zzyńska-Granica, B., & Kiss, A. K. (2013). Antioxidant and anti-inflammatory flavonol glucuronides from *Polygonum aviculare* L. *Fitoterapia*, *91*, 180–188. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2013.08.026>
- Greenberg, J. D., Fisher, M. C., Kremer, J., Chang, H., Rosenstein, E. D., Kishimoto, M., Lee, S., Yazici, Y., Kavanaugh, A., Abramson, S. B., Jeffrey, A., Greenberg, D., Fisher, M. C., Kremer, J., Chang, H., Rosenstein, E. D., Kishimoto, M., Lee, S., Yazici, Y., ... Greenberg, J. D. (2009). The COX-2 inhibitor market withdrawals and prescribing patterns by rheumatologists in patients with gastrointestinal and cardiovascular risk Coxib withdrawal impact on GI prophylaxis. In *Clinical and Experimental Rheumatology* (Vol. 27).
- Griffon-Etienne, G., Boucher, Y., Brekken, C., Suit, H. D., & Jain, R. K. (1999). Taxane-induced apoptosis decompresses blood vessels and lowers interstitial fluid pressure in solid tumors: clinical implications. *Cancer Research*, *59*(15), 3776–3782.
- Guimarães, R., Barreira, J. C. M., Barros, L., Carvalho, A. M., & Ferreira, I. C. F. R. (2011). Effects of oral dosage form and storage period on the antioxidant properties of four species used in traditional herbal medicine. *Phytotherapy Research*, *25*(4), 484–492. <https://doi.org/10.1002/ptr.3284>
- Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. In *Archives of Toxicology* (Vol. 94, Issue 3, pp. 651–715). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3>
- Guo, H., Ding, H., Tang, X., Liang, M., Li, S., Zhang, J., & Cao, J. (2021). Quercetin induces pro-apoptotic autophagy via SIRT1/AMPK signaling pathway in human lung cancer cell lines A549 and H1299 in vitro. *Thoracic Cancer*, *12*(9), 1415–1422.
- Habibi, R. M., Mohammadi, R. A., Delazar, A., Halabian, R., Soleimani, R. J., Mehdipour, A., Bagheri, M., & Jahanian-Najafabadi, A. (2011). Effects of *Polygonum aviculare* herbal extract on proliferation and

- apoptotic gene expression of MCF-7. *Daru: Journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences*, 19(5), 326.
- Hadifar, S., Mostafaei, S., Behrouzi, A., Fateh, A., Riahi, P., Siadat, S. D., & Vaziri, F. (2021). Strain-specific behavior of *Mycobacterium tuberculosis* in A549 lung cancer cell line. *BMC Bioinformatics*, 22(1), 1–12.
- Hadjipavlou-Litina, D. J., Litinas, K. E., & Kontogiorgis, C. (2007). The Anti-inflammatory Effect of Coumarin and its Derivatives. In *Allergy Agents in Medicinal Chemistry* (Vol. 6).
- Hameed, E. (2012). Phytochemical Studies and Evaluation of Antioxidant, Anticancer and Antimicrobial Properties of *Conocarpus erectus* L. Growing in Taif, Saudi Arabia. *European Journal of Medicinal Plants*, 2(2), 93–112. <https://doi.org/10.9734/ejmp/2012/1040>
- Hammond, G. B., Fernández, I. D., Villegas, L. F., & Vaisberg, A. J. (1998). A survey of traditional medicinal plants from the Callejón de Huaylas, Department of Ancash, Perú. *Journal of Ethnopharmacology*, 61(1), 17–30.
- Harris, I. S., & DeNicola, G. M. (2020). The Complex Interplay between Antioxidants and ROS in Cancer. In *Trends in Cell Biology* (Vol. 30, Issue 6, pp. 440–451). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.03.002>
- Hawksworth, D. L., & Lücking, R. (2017). Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. *Microbiology Spectrum*, 5(4), 4–5.
- Hohmann, M. S. N., Longhi-Balbinot, D. T., Guazelli, C. F. S., Navarro, S. A., Zarpelon, A. C., Casagrande, R., Arakawa, N. S., & Verri Jr, W. A. (2016). Sesquiterpene lactones: structural diversity and perspectives as anti-inflammatory molecules. *Studies in Natural Products Chemistry*, 49, 243–264.
- Hoobler, E. K., Rai, G., Warrillow, A. G. S., Perry, S. C., Smyrniotis, C. J., Jadhav, A., Simeonov, A., Parker, J. E., Kelly, D. E., & Maloney, D. J. (2013). Discovery of a novel dual fungal CYP51/human 5-lipoxygenase inhibitor: implications for anti-fungal therapy. *PLoS One*, 8(6), e65928.
- Howes, M. J. R., Quave, C. L., Collemare, J., Tatsis, E. C., Twilley, D., Lulekal, E., Farlow, A., Li, L., Cazar, M. E., Leaman, D. J., Prescott, T. A. K., Milliken, W., Martin, C., de Canha, M. N., Lall, N., Qin, H., Walker, B. E., Vásquez-Londoño, C., Allkin, B., ... Nic Lughadha, E. (2020). Molecules from nature: Reconciling biodiversity conservation and global healthcare imperatives for sustainable use of medicinal plants and fungi. In *Plants People Planet* (Vol. 2, Issue 5, pp. 463–481). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/ppp3.10138>
- Hsu, C.-Y. (2006a). Antioxidant activity of extract from *Polygonum aviculare* L. In *HSU Biol Res* (Vol. 39).
- Hsu, H. F., Wu, Y. C., Chen, L. C., & Houng, J. Y. (2009). Induction of apoptosis of A549 lung cancer cell line by dehydrocostus lactone isolated from *Glossogyne tenuifolia*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 17(2), 5.

- Hu, H., Zhang, Z., Lei, Z., Yang, Y., & Sugiura, N. (2009). Comparative study of antioxidant activity and antiproliferative effect of hot water and ethanol extracts from the mushroom *Inonotus obliquus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *107*(1), 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2008.09.004>
- Hua, P., Zhang, G., Zhang, Y., Sun, M., Cui, R., Li, X., Li, B., & Zhang, X. (2016). Costunolide induces G1/S phase arrest and activates mitochondrial-mediated apoptotic pathways in SK-MES 1 human lung squamous carcinoma cells. *Oncology Letters*, *11*(4), 2780–2786. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4295>
- Huang, W.-Y., Cai, Y.-Z., Xing, J., Corke, H., & Sun, M. (2007). A potential antioxidant resource: endophytic fungi from medicinal plants. *Economic Botany*, *61*(1), 14–30.
- Hussain, T., Tan, B., Yin, Y., Blachier, F., Tossou, M. C. B., & Rahu, N. (2016). Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Vol. 2016). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2016/7432797>
- Jamzad, M., & Kamari Bidkorpheh, M. (2020). Green synthesis of iron oxide nanoparticles by the aqueous extract of *Laurus nobilis* L. leaves and evaluation of the antimicrobial activity. *Journal of Nanostructure in Chemistry*, *10*(3), 193–201.
- Jardim, R., & de Sequeira, M. M. (2021). New taxa to the flora of Madeira archipelago islands (Portugal). *Botanica Complutensis*, *45*, 1–12. <https://doi.org/10.5209/BOCM.78245>
- Jardim, R., Menezes de Sequeira, M., Borges, P. A. v, Abreu, C., Aguiar, A. M. F., & Carvalho, P. (2008). The vascular plants (Pteridophyta and Spermatophyta) of the Madeira and Selvagens archipelagos. *A List of the Terrestrial Fungi, Flora and Fauna of Madeira and Selvagens Archipelagos. Funchal and Angra Do Heroísmo: Direcção Regional Do Ambiente Da Madeira and Universidade Dos Açores*, 157–207.
- Jemâa, J. M. ben, Tersim, N., Toudert, K. T., & Khouja, M. L. (2012). Insecticidal activities of essential oils from leaves of *Laurus nobilis* L. from Tunisia, Algeria and Morocco, and comparative chemical composition. *Journal of Stored Products Research*, *48*, 97–104.
- Jeon, C. B., Kim, Y. H., Batsuren, D., Tunsag, J., Nho, C. W., Pan, C.-H., & Lee, J. K. (2013). Immune-stimulating effects of *Polygonum aviculare* L. extract on macrophages. *Yakhak Hoeji*, *57*(6), 394–399.
- Jovanović, M., Tenji, D., Nikolić, B., Srdić-Rajić, T., Svirčev, E., & Mitić-Ćulafić, D. (2021). In vitro study of two edible polygonoideae plants: Phenolic profile, cytotoxicity, and modulation of keap1-nrf2 gene expression. *Foods*, *10*(4). <https://doi.org/10.3390/foods10040811>
- Jucá, M. M., Cysne Filho, F. M. S., de Almeida, J. C., Mesquita, D. da S., Barriga, J. R. de M., Dias, K. C. F., Barbosa, T. M., Vasconcelos, L. C., Leal, L. K. A. M., Ribeiro, J. E., & Vasconcelos, S. M. M. (2020). Flavonoids: biological activities and therapeutic potential. In *Natural Product Research* (Vol. 34,

Issue 5, pp. 692–705). Taylor and Francis Ltd.
<https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1493588>

- Juergens, U. R., Dethlefsen, U., Steinkamp, G., Gillissen, A., Reppes, R., & Vetter, H. (2003). Anti-inflammatory activity of 1,8-cineol (eucalyptol) in bronchial asthma: a double-blind placebo-controlled trial. *Respiratory Medicine*, *97*(3), 250–256.
- Kamble, S. S., & Gacche, R. N. (2019). "Evaluation of anti-breast cancer, anti-angiogenic and antioxidant properties of selected medicinal plants." *European Journal of Integrative Medicine*, *25*, 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2018.11.006>
- Khaledi, M., Khaledi, F., Asadi-Samani, M., Gholipour, A., & Mahmoodi Kouhi, A. (2018). Phytochemical evaluation and antibacterial effects of *Medicago sativa*, *Onosma sericeum*, *Parietaria judaica* L., *Phlomis persica* and *Echinophora platyloba* DC. on *Enterococcus faecalis*. *Biomedical Research and Therapy*, *5*(1), 1941–1951. <https://doi.org/10.15419/bmrat.v5i1.408>
- Kim, H. P., Park, H., Son, K. H., Chang, H. W., & Kang, S. S. (2008). Biochemical pharmacology of biflavonoids: implications for anti-inflammatory action. *Archives of Pharmacal Research*, *31*(3), 265–273.
- King, T., Dykes, G., & Kristianti, R. (2008). Comparative Evaluation of Methods Commonly Used to Determine Antimicrobial Susceptibility to Plant Extracts and Phenolic Compounds. *Journal of AOAC International*, *91*(6). <https://academic.oup.com/jaoac/article/91/6/1423/5656174>
- Klančnik, A., Piskernik, S., Jeršek, B., & Možina, S. S. (2010). Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of Microbiological Methods*, *81*(2), 121–126. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.02.004>
- Kocabas, B., Attar, A., Peksel, A., & Yapaoz, M. (2021). Phytosynthesis of CuONPs via *Laurus nobilis*: Determination of antioxidant content, antibacterial activity, and dye decolorization potential. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, *68*(4), 889–895. <https://doi.org/10.1002/bab.2010>
- Kondraskov, P., Schütz, N., Schüßler, C., de Sequeira, M. M., Guerra, A. S., Caujapé-Castells, J., Jaén-Molina, R., Marrero-Rodríguez, Á., Koch, M. A., Linder, P., Kovar-Eder, J., Thiv, M., & Buerki, S. (2015). Biogeography of mediterranean hotspot biodiversity: Re-evaluating the tertiary relict' hypothesis of macaronesian laurel forests. *PLoS ONE*, *10*(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132091>
- Kozarski, M., Klaus, A., Niksic, M., Jakovljevic, D., Helsper, J. P. F. G., & van Griensven, L. J. L. D. (2011). Antioxidative and immunomodulating activities of polysaccharide extracts of the medicinal mushrooms *Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, *Ganoderma lucidum* and *Phellinus linteus*. *Food Chemistry*, *129*(4), 1667–1675.
- Kusari, S., Hertweck, C., & Spiteller, M. (2012). Chemical ecology of endophytic fungi: Origins of secondary metabolites. In *Chemistry and Biology* (Vol. 19, Issue 7, pp. 792–798). <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.06.004>

- Langfield, R. D., Scarano, F. J., Heitzman, M. E., Kondo, M., Hammond, G. B., & Neto, C. C. (2004). Use of a modified microplate bioassay method to investigate antibacterial activity in the Peruvian medicinal plant *Peperomia galioides*. *Journal of Ethnopharmacology*, *94*(2–3), 279–281. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.06.013>
- Langhansova, L., Landa, P., Kutil, Z., Tauchen, J., Marsik, P., Rezek, J., Lou, J. D., Yun, Z. L., & Vanek, T. (2017). *Myrica rubra* leaves as a potential source of a dual 5-LOX/COX inhibitor. *Food and Agricultural Immunology*, *28*(2), 343–353. <https://doi.org/10.1080/09540105.2016.1272554>
- Lee, E. H., Shin, J. H., Kim, S. S., Lee, H., Yang, S., & Seo, S. R. (2019). *Laurus nobilis* leaf extract controls inflammation by suppressing NLRP3 inflammasome activation. *Journal of Cellular Physiology*, *234*(5), 6854–6864.
- Lee, H. K., Song, H. E., Lee, H. B., Kim, C. S., Koketsu, M., Ngan, L. T. M., & Ahn, Y. J. (2014). Growth inhibitory, bactericidal, and morphostructural effects of dehydrocostus lactone from *magnolia sieboldii* leaves on antibiotic-susceptible and -resistant strains of *helicobacter pylori*. *PLoS ONE*, *9*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095530>
- Lee, S. H., Cho, Y. C., & Lim, J. S. (2021). Costunolide, a sesquiterpene lactone, suppresses skin cancer via induction of apoptosis and blockage of cell proliferation. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(4), 1–16. <https://doi.org/10.3390/ijms22042075>
- Lee, T.-S., Tsai, H.-L., & Chau, L.-Y. (2003). Induction of heme oxygenase-1 expression in murine macrophages is essential for the anti-inflammatory effect of low dose 15-deoxy- Δ 12, 14-prostaglandin J2. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(21), 19325–19330.
- Lee, Y. S., & Choi, E. M. (2011). Costunolide stimulates the function of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *International Immunopharmacology*, *11*(6), 712–718. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2011.01.018>
- Leung, P.-C. (2007). The efficacy of Chinese medicine for SARS: a review of Chinese publications after the crisis. *The American Journal of Chinese Medicine*, *35*(04), 575–581.
- Lev, E., & Amar, Z. (2000). Ethnopharmacological survey of traditional drugs sold in Israel at the end of the 20th century. *Journal of Ethnopharmacology*, *72*(1–2), 191–205.
- Li, Q., Wang, Z., Xie, Y., & Hu, H. (2020). Antitumor activity and mechanism of costunolide and dehydrocostus lactone: Two natural sesquiterpene lactones from the Asteraceae family. In *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 125). Elsevier Masson SAS. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.109955>
- Lieber, M., Todaro, G., Smith, B., Szakal, A., & Nelson-Rees, W. (1976). A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *International Journal of Cancer*, *17*(1), 62–70.
- Ligaa, U., Davaasuren, B., & Ninjil, N. (2005). Medicinal Plants of Mongolia Used in Western and Eastern Medicine. (p. 651). *Ulaanbaatar: JCK Printing*.

- Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., Gargiulo, G., Testa, G., Cacciatore, F., Bonaduce, D., & Abete, P. (2018). Oxidative stress, aging, and diseases. In *Clinical Interventions in Aging* (Vol. 13, pp. 757–772). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/CIA.S158513>
- Lima, C. F., Valentao, P. C. R., Andrade, P. B., Seabra, R. M., Fernandes-Ferreira, M., & Pereira-Wilson, C. (2007). Water and methanolic extracts of *Salvia officinalis* protect HepG2 cells from t-BHP induced oxidative damage. *Chemico-Biological Interactions*, *167*(2), 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2007.01.020>
- Lin, X., Peng, Z., & Su, C. (2015). Potential anti-cancer activities and mechanisms of costunolide and dehydrocostuslactone. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 16, Issue 5, pp. 10888–10906). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms160510888>
- Liscombe, D. K., & Facchini, P. J. (2008). Evolutionary and cellular webs in benzyloquinoline alkaloid biosynthesis. *Current Opinion in Biotechnology*, *19*(2), 173–180.
- Liu, C. Y., Chang, H. S., Chen, I. S., Chen, C. J., Hsu, M. L., Fu, S. L., & Chen, Y. J. (2011). Costunolide causes mitotic arrest and enhances radiosensitivity in human hepatocellular carcinoma cells. *Radiation Oncology*, *6*(1). <https://doi.org/10.1186/1748-717X-6-56>
- Liu, J., Manheimer, E., Shi, Y., & Gluud, C. (2004). Chinese herbal medicine for severe acute respiratory syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Alternative & Complementary Medicine*, *10*(6), 1041–1051.
- Liu, Y., Fernie, A. R., & Tohge, T. (2022). Diversification of Chemical Structures of Methoxylated Flavonoids and Genes Encoding Flavonoid-O-Methyltransferases. *Plants*, *11*(4). <https://doi.org/10.3390/plants11040564>
- Llorent-Martínez, E. J., Spínola, V., & Castilho, P. C. (2017). Phenolic profiles of Lauraceae plant species endemic to Laurisilva forest: A chemotaxonomic survey. *Industrial Crops and Products*, *107*, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.05.023>
- Loi, M. C., Maxia, L., & Maxia, A. (2005). Ethnobotanical comparison between the villages of Escolca and Lotzorai (Sardinia, Italy). *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, *11*(3), 67–84.
- Loi, M. C., Poli, F., Sacchetti, G., Selenu, M. B., & Ballero, M. (2004). Ethnopharmacology of ogliastra (villagrande strisaili, sardinia, Italy). *Fitoterapia*, *75*(3–4), 277–295.
- Luna-Herrera, J., Costa, M. C., González, H. G., Rodrigues, A. I., & Castilho, P. C. (2007). Synergistic antimycobacterial activities of sesquiterpene lactones from *Laurus* spp. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *59*(3), 548–552. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl523>
- Macáková, K., Opletal, L., Polášek, M., & Samková, V. (2010). Free-radical Scavenging Activity of some European Polyporales. *Natural Product Communications*, *5*, 923–926.

- Macchioni, F., Castilho, P. C., Cecchi, F., Cioni P, L., Morelli, I., & Perrucci, S. (2005). Acaricidal activity of *Laurus novocanariensis* and *Laurus nobilis* leaf essential oil against *Psoroptes cuniculi*. *Phytotherapy—the Role of an Ancient Tradition in Modern Times*, 133.
- Macchioni, F., Perrucci, S., Cioni, P., Morelli, I., Castilho, P., & Cecchi, F. (2006). Composition and acaricidal activity of *Laurus novocanariensis* and *Laurus nobilis* essential oils against *Psoroptes cuniculi*. *Journal of Essential Oil Research*, 18(1), 111–114.
- Macedo, T., Ferreres, F., Pereira, D. M., Oliveira, A. P., Gomes, N. G. M., Gil-Izquierdo, Á., Valentão, P., Araújo, L., & Andrade, P. B. (2021). *Cassia sieberiana* DC. leaves modulate LPS-induced inflammatory response in THP-1 cells and inhibit eicosanoid-metabolizing enzymes. *Journal of Ethnopharmacology*, 269. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113746>
- Macías, F. A., Galindo, J. L. G., & Galindo, J. C. G. (2007). Evolution and current status of ecological phytochemistry. In *Phytochemistry* (Vol. 68, Issues 22–24, pp. 2917–2936). <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.10.010>
- Macías F. A., Molinillo, J. M., Galindo, J. C., Varela, R. M., Torres, A., Simonet, & A. M. (1999). Terpenoids with potential use as natural herbicide templates. In *Biologically Active Natural Products: Agrochemicals* (pp. 15–31).
- Mahiou, V., Roblot, F., Hocquemiller, R., Cavé, A., Barrios, A. A., Fournet, A., & Ducrot, P.-H. (1995). Piperogalin, a new prenylated diphenol from *Peperomia galioides*. *Journal of Natural Products*, 58(2), 324–328.
- Mahiou, V., Roblot, F., Hocquemiller, R., Cavé, A., Rojas, A., Arias, D., Inchausti, A., Yaluff, G., & Fournet, A. (1996). New Prenylated Quinones from *Peperomia galioides*. In *J. Nat. Prod* (Vol. 59). <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
- Mani, V. M., Gnana Soundari, A. P., Karthiyaini, D., & Preethi, K. (2015). Bioprospecting endophytic fungi and their metabolites from medicinal tree *Aegle marmelos* in Western Ghats, India. *Mycobiology*, 43(3), 303–310.
- Mannucci, C., Casciaro, M., Sorbara, E. E., Calapai, F., di Salvo, E., Pioggia, G., Navarra, M., Calapai, G., & Gangemi, S. (2021). Nutraceuticals against oxidative stress in autoimmune disorders. In *Antioxidants* (Vol. 10, Issue 2, pp. 1–25). MDPI. <https://doi.org/10.3390/antiox10020261>
- Martin, M., Diaz, M., Montero, M., Prieto, P., San Roman, L., & Cortes, D. (1993). Antispasmodic Activity of Benzylisoquinoline Alkaloids Analogous to Papaverine. *Planta Medica*, 59.
- Martin, M. L., Sagredo, J. A., Morais, J. M., Montero, M. J., Sanchez, M. T., & Roman, L. S. (1988). Uterine inhibitory effect of reticuline. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 40(11), 801–802. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1988.tb05176.x>

- Martin, M. L., Sagredo, J. A., Morais, J., Sánchez, M. T., Sevilla, M. A., & San Roman, L. (1989). Pharmacological study of certain extracts of *Laurobasidium lauri*. *Journal of Ethnopharmacology*, *27*(1–2), 71–80.
- Martinez, M. B., Flickinger, M., Higgins, L. A., Krick, T., & Nelsestuen, G. L. (2001). Reduced outer membrane permeability of *Escherichia coli* O157:H7: Suggested role of modified outer membrane porins and theoretical function in resistance to antimicrobial agents. *Biochemistry*, *40*(40), 11965–11974. <https://doi.org/10.1021/bi0109515>
- Mathe, G., & Reizenstein, P. (1985). Phase I pharmacologic study of a new Vinca alkaloid: navelbine. *Cancer Letters*, *27*(3), 285–293.
- Matsuda, H., Kagerura, T., Toguchida, I., Ueda, H., Morikawa, T., & Yoshikawa, M. (2000). Inhibitory effects of sesquiterpenes from bay leaf on nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated macrophages: structure requirement and role of heat shock protein induction. *Life Sciences*, *66*(22), 2151–2157.
- Matsuda, H., Shimoda, H., Ninomiya, K., & Yoshikawa, M. (2002). Inhibitory mechanism of costunolide, a sesquiterpene lactone isolated from *Laurus nobilis*, on blood-ethanol elevation in rats: involvement of inhibition of gastric emptying and increase in gastric juice secretion. *Alcohol and Alcoholism*, *37*(2), 121–127.
- Mattalia, G., Sökand, R., Corvo, P., & Pieroni, A. (2020). Blended divergences: Local food and medicinal plant uses among Arbëreshë, Occitans, and autochthonous Calabrians living in Calabria, Southern Italy. *Plant Biosystems—An International Journal Dealing with All Aspects of Plant Biology*, *154*(5), 615–626.
- Maxia, A., Lancioni, M. C., Balia, A. N., Alborghetti, R., Pieroni, A., & Loi, M. C. (2008). Medical ethnobotany of the Tabarkins, a Northern Italian (Ligurian) minority in south-western Sardinia. *Genetic Resources and Crop Evolution*, *55*(6), 911–924. <https://doi.org/10.1007/s10722-007-9296-4>
- Mayer, R., Stecher, G., Wuerzner, R., Silva, R. C., Sultana, T., Trojer, L., Feuerstein, I., Krieg, C., Abel, G., Popp, M., Bobleter, O., & Bonn, G. K. (2008). Proanthocyanidins: Target compounds as antibacterial agents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(16), 6959–6966. <https://doi.org/10.1021/jf800832r>
- Medeiros, M. A. A., Nunes, X. P., Barbosa-Filho, J. M., Lemos, V. S., Pinho, J. F., Roman-Campos, D., de Medeiros, I. A., Araújo, D. A. M., & Cruz, J. S. (2009). (S)-reticuline induces vasorelaxation through the blockade of L-type Ca²⁺ channels. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, *379*(2), 115–125. <https://doi.org/10.1007/s00210-008-0352-1>
- Menale, B., de Castro, O., Cascone, C., & Muoio, R. (2016). Ethnobotanical investigation on medicinal plants in the Vesuvio National Park (Campania, southern Italy). *Journal of Ethnopharmacology*, *192*, 320–349.

- Menale, B., de Castro, O., di Iorio, E., Ranaldi, M., & Muoio, R. (2022). Discovering the ethnobotanical traditions of the island of Procida (Campania, southern Italy). *Plant Biosystems—An International Journal Dealing with All Aspects of Plant Biology*, *156*(2), 450–468.
- Messina, S., Bitto, A., Aguenouz, M., Mazzeo, A., Migliorato, A., Polito, F., Irrera, N., Altavilla, D., Vita, G. L., & Russo, M. (2009). Flavocoxid counteracts muscle necrosis and improves functional properties in mdx mice: a comparison study with methylprednisolone. *Experimental Neurology*, *220*(2), 349–358.
- Miraldi, E., & Bains, G. (2019). Evolution and current status of ecological phytochemistry. *Journal of the Siena Academy of Sciences*, *10*(1). <https://doi.org/10.4081/jsas.2018.8529>
- Morais, J. (1987). *Identificação e acção farmacológica de alguns constituintes do fungo parasita Laurobasidium lauri (Geyler) Julich e a sua detecção na planta hospedeira Laurus azorica (Seub) Franco*. Tese de Doutoramento, Universidade de Lisboa]. .
- Morais, L. C. S. L., Barbosa-Filho, J. M., & Almeida, R. N. (1998). Central depressant effects of reticuline extracted from *Ocotea duckei* in rats and mice. In *Journal of Ethnopharmacology* (Vol. 62).
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, *65*(1–2), 55–63.
- Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(7), 3380.
- Musial, C., Kuban-Jankowska, A., & Gorska-Ponikowska, M. (2020). Beneficial properties of green tea catechins. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(5), 1744.
- Naczek, M., & Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. In *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (Vol. 41, Issue 5, pp. 1523–1542). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.04.002>
- Nadeem, M. A., Aasim, M., Kirici, S., Karik, Ü., Nawaz, M. A., Yilmaz, A., Maral, H., Khawar, K. M., & Baloch, F. S. (2018). Laurel (*Laurus nobilis* L.): A less-known medicinal plant to the world with diffusion, genomics, phenomics, and metabolomics for genetic improvement. In *Biotechnological Approaches for Medicinal and Aromatic Plants: Conservation, Genetic Improvement and Utilization* (pp. 631–653). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0535-1_28
- Nafis, A., Kasrati, A., Jamali, C. A., Custódio, L., Vitalini, S., Iriti, M., & Hassani, L. (2020). A comparative study of the in vitro antimicrobial and synergistic effect of essential oils from *Laurus nobilis* L. and *Prunus armeniaca* L. from Morocco with antimicrobial drugs: New approach for health promoting products. *Antibiotics*, *9*(4), 140.
- Nakaoji, K., Nayeshiro, H., & TAKAHASHI, T. (1997). Norreticuline and reticuline as possible new agents for hair growth acceleration. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, *20*(5), 586–588.

- Naveen, P., Lingaraju, H. B., Chandrappa, S., Priya, K. S., & Prasad, K. S. (2018). Validation of High-Performance Liquid Chromatography Method for Quantification of Costunolide Content in *Laurus nobilis*. *Pharmacognosy Research*, *10*(4).
- Neto, C. C., Owens, C. W., Langfield, R. D., Comeau, A. B., St Onge, J., Vaisberg, A. J., & Hammond, G. B. (2002). Antibacterial activity of some Peruvian medicinal plants from the Callejon de Huaylas. In *Journal of Ethnopharmacology* (Vol. 79). www.elsevier.com/locate/jethpharm
- Newsholme, P., Cruzat, V. F., Keane, K. N., Carlessi, R., & de Bittencourt, P. I. H. (2016). Molecular mechanisms of ROS production and oxidative stress in diabetes. In *Biochemical Journal* (Vol. 473, Issue 24, pp. 4527–4550). Portland Press Ltd. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160503C>
- Newsholme, P., Haber, E. P., Hirabara, S. M., Rebelato, E. L. O., Procopio, J., Morgan, D., Oliveira-Emilio, H. C., Carpinelli, A. R., & Curi, R. (2007). Diabetes associated cell stress and dysfunction: Role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity. In *Journal of Physiology* (Vol. 583, Issue 1, pp. 9–24). <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.135871>
- Nguyen, H. T., Vu, T.-Y., Chandi, V., Polimati, H., & Tatipamula, V. B. (2020). Dual COX and 5-LOX inhibition by clerodane diterpenes from seeds of *Polyalthia longifolia* (Sonn.) Thwaites. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–10.
- Nurdjannah, N., & Bermawie, N. (2012). *Handbook of Herbs and Spices*. Elsevier: Amsterdam, The Netherlands.
- Oestvang, J., & Johansen, B. (2006). PhospholipaseA2: a key regulator of inflammatory signalling and a connector to fibrosis development in atherosclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1761*(11), 1309–1316.
- Oka, Y., Nacar, S., Putievsky, E., Ravid, U., Yaniv, Z., & Spiegel, Y. (2000). Nematicidal activity of essential oils and their components against the root-knot nematode. *Phytopathology*, *90*(7), 710–715.
- Okubo, S., Ohta, T., Fujita, H., Shoyama, Y., & Uto, T. (2021). Costunolide and dehydrocostuslactone from *Saussurea lappa* root inhibit autophagy in hepatocellular carcinoma cells. *Journal of Natural Medicines*, *75*(1), 240–245. <https://doi.org/10.1007/s11418-020-01462-1>
- Olszowy, M. (2019). What is responsible for antioxidant properties of polyphenolic compounds from plants? In *Plant Physiology and Biochemistry* (Vol. 144, pp. 135–143). Elsevier Masson SAS. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.09.039>
- Ondua, M., Njoya, E. M., Abdalla, M. A., & McGaw, L. J. (2019). Anti-inflammatory and antioxidant properties of leaf extracts of eleven South African medicinal plants used traditionally to treat inflammation. *Journal of Ethnopharmacology*, *234*, 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.12.030>

- Ouchikh, O., Chahed, T., Ksouri, R., Taarit, M. ben, Faleh, H., Abdelly, C., Kchouk, M. E., & Marzouk, B. (2011). The effects of extraction method on the measured tocopherol level and antioxidant activity of *L. nobilis* vegetative organs. *Journal of Food Composition and Analysis*, *24*(1), 103–110.
- Ozcan, B., Esen, M., Sangun, M. K., Coleri, A., & Caliskan, M. (2010). Effective antibacterial and antioxidant properties of methanolic extract of *Laurus nobilis* seed oil. *Journal of Environmental Biology*, *31*(5), 637–641.
- Ozturk, M., Altay, V., & Gönenç, T. M. (2017). Herbals from the High Mountains in the East Mediterranean. In *Drug Discovery from Herbs: Approaches and Applications* (pp. 327–367). DAYA Publishing House, New Delhi. <https://www.researchgate.net/publication/308984364>
- P. S. Kalsi, v. K. VD, O. S. Singi, & M. S. Wadia. (1977). Terpenoid lactones as plant growth regulators. *Phytochemistry*, *17*, 784–786.
- Pae, H.-O., Jeong, G.-S., Kim, H.-S., Woo, W. H., Rhew, H. Y., Kim, H. S., Sohn, D. H., Kim, Y.-C., & Chung, H.-T. (2007). Costunolide inhibits production of tumor necrosis factor- α and interleukin-6 by inducing heme oxygenase-1 in RAW264.7 macrophages. *Inflammation Research*, *56*(12), 520–526.
- Paparella, A., Nawade, B., Shaltiel-Harpaz, L., & Ibdah, M. (2022). A Review of the Botany, Volatile Composition, Biochemical and Molecular Aspects, and Traditional Uses of *Laurus nobilis*. In *Plants* (Vol. 11, Issue 9). MDPI. <https://doi.org/10.3390/plants11091209>
- Park, J., Lee, C., & Park, H. (1997). Anti-Helicobacter pylori Effect of Costunolide Isolated from the Stem Bark of *Magnolia sieboldii*. In *Arch. Pharm. Res* (Vol. 20, Issue 3).
- Park, S. H., Jang, S., Son, E., Lee, S. W., Park, S. D., Sung, Y.-Y., & Kim, H. K. (2018). Polygonum aviculare L. extract reduces fatigue by inhibiting neuroinflammation in restraint-stressed mice. *Phytomedicine*, *42*, 180–189.
- Park, S., Sung, Y., Nho, K., & Kim, H. (2014). Anti-atherosclerotic effects of Polygonum aviculare L. ethanol extract in ApoE knock-out mice fed a Western diet mediated via the MAPK pathway. *Journal of Ethnopharmacology*, *151*(3), 1109–1115.
- Passalacqua, N. G., Guarrera, P. M., & de Fine, G. (2007). Contribution to the knowledge of the folk plant medicine in Calabria region (Southern Italy). *Fitoterapia*, *78*(1), 52–68. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2006.07.005>
- Pech, B., & Bruneton, J. (1982). Alcaloïdes du laurier noble, *Laurus nobilis*. *Journal of Natural Products*, *45*(5), 560–563.
- Peixoto, L. R., Rosalen, P. L., Ferreira, G. L. S., Freires, I. A., de Carvalho, F. G., Castellano, L. R., & de Castro, R. D. (2017). Antifungal activity, mode of action and anti-biofilm effects of *Laurus nobilis* Linnaeus essential oil against *Candida* spp. *Archives of Oral Biology*, *73*, 179–185.

- Peñaherrera, E., Jerves-Andrade, L., Cuzco, N., Wilches, I., León-Tamariz, F., & Tobar, V. (2016). Efecto antiinflamatorio de extractos metanólicos de plantas de Azuay y Loja (Ecuador) a través del modelo de Peces Cebra. *Revista de La Facultad de Ciencias Químicas*, *14*, 1–12.
- Penesyán, A., Gillings, M., & Paulsen, I. T. (2015). Antibiotic discovery: Combatting bacterial resistance in cells and in biofilm communities. In *Molecules* (Vol. 20, Issue 4, pp. 5286–5298). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules20045286>
- Peng, Z., Wang, Y., Fan, J., Lin, X., Liu, C., Xu, Y., Ji, W., Yan, C., & Su, C. (2017). Costunolide and dehydrocostuslactone combination treatment inhibit breast cancer by inducing cell cycle arrest and apoptosis through c-Myc/p53 and AKT/14-3-3 pathway. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–16.
- Perron, N. R., & Brumaghim, J. L. (2009). A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochemistry and Biophysics*, *53*(2), 75–100.
- Petty, R. D., Sutherland, L. A., Hunter, E. M., & Cree, I. A. (1995). Comparison of MTT and ATP-based assays for the measurement of viable cell number. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence*, *10*(1), 29–34.
- Picman, A. K. (1986). Biological activities of sesquiterpene lactones. *Biochemical Systematics and Ecology*, *14*(3), 255–281.
- Pitchai, D., Roy, A., & Banu, S. (2014). In vitro and in silico evaluation of NF- κ B targeted costunolide action on estrogen receptor-negative breast cancer cells—A comparison with normal breast cells. *Phytotherapy Research*, *28*(10), 1499–1505. <https://doi.org/10.1002/ptr.5155>
- Powers, S. K., Deminice, R., Ozdemir, M., Yoshihara, T., Bomkamp, M. P., & Hyatt, H. (2020). Exercise-induced oxidative stress: Friend or foe? In *Journal of Sport and Health Science* (Vol. 9, Issue 5, pp. 415–425). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jshs.2020.04.001>
- Qadi, M., Jaradat, N., Al-Lahham, S., Ali, I., Abualhasan, M. N., Shraim, N., Hussein, F., Issa, L., Mousa, A., Zarour, A., Badrasawi, A., Baarah, A. M., & Al-Omari, R. (2020). Antibacterial, Anticandidal, Phytochemical, and Biological Evaluations of Pellitory Plant. *BioMed Research International*, *2020*. <https://doi.org/10.1155/2020/6965306>
- Quinn, R. A., Nothias, L. F., Vining, O., Meehan, M., Esquenazi, E., & Dorrestein, P. C. (2017). Molecular Networking As a Drug Discovery, Drug Metabolism, and Precision Medicine Strategy. In *Trends in Pharmacological Sciences* (Vol. 38, Issue 2, pp. 143–154). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.10.011>
- Ramos, C., Teixeira, B., Batista, I., Matos, O., Serrano, C., Neng, N. R., Nogueira, J. M. F., Nunes, M. L., & Marques, A. (2012). Antioxidant and antibacterial activity of essential oil and extracts of bay laurel *Laurus nobilis* Linnaeus (Lauraceae) from Portugal. *Natural Product Research*, *26*(6), 518–529. <https://doi.org/10.1080/14786419.2010.531478>

- Ramos, Y., & Moreira, D. (2019). Seasonal study of the essential oil from aerial parts of *Peperomia galioides* kunth (Piperaceae). *Revista Virtual de Quimica*, 11(5), 1540–1549. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20190107>
- Rasoanaivo, P., Ratsimamanga-Urverg, S., Rafatro, H., Ramanitrahasimbola, D., Palazzino, G., Galeffi, C., & Nicoletti, M. (1998). Alkaloids of *Hernandia voyronii*: chloroquine-potentiating activity and structure elucidation of herveline D. *Planta Medica*, 64(01), 58–62.
- Rasul, A., Bao, R., Malhi, M., Zhao, B., Tsuji, I., Li, J., & Li, X. (2013). Induction of apoptosis by costunolide in bladder cancer cells is mediated through ROS generation and mitochondrial dysfunction. *Molecules*, 18(2), 1418–1433. <https://doi.org/10.3390/molecules18021418>
- Regalado, C. M., & Ritter, A. (2021). Fog mitigates the consequences of a profligate water use strategy in a Macaronesian cloud forest tree species. *Journal of Hydrology*, 593. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2020.125871>
- Review on Antimicrobial Resistance. (2014). *Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations*. Review on Antimicrobial Resistance.
- Riabov, P. A., Micić, D., Božović, R. B., Jovanović, D. v, Tomić, A., Šovljanski, O., Filip, S., Tosti, T., Ostojić, S., & Blagojević, S. (2020). The chemical, biological and thermal characteristics and gastronomical perspectives of *Laurus nobilis* essential oil from different geographical origin. *Industrial Crops and Products*, 151, 112498.
- Rivas-Martínez, S., Fernández-González, F., Loidi, J., Lousã, M., & Penas, A. (2001). Syntaxonomical checklist of vascular plant communities of Spain and Portugal to association level. *Itinera Geobotanica*, 14, 5–341. <https://www.researchgate.net/publication/216034253>
- Rivera, D., & Obón, C. (1995). The ethnopharmacology of Madeira and Porto Santo Island, a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 46, 73–93.
- Rizwana, H., al Kubaisi, N., Al-Meghailaith, N. N., Moubayed, N. M. S., & Albasher, G. (2019). Evaluation of Chemical Composition, Antibacterial, Antifungal, and Cytotoxic Activity of *Laurus nobilis* L Grown in Saudi Arabia. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 13(4), 2073–2086.
- Robinson, A., Kumar, T. V., Sreedhar, E., Naidu, V. G. M., Krishna, S. R., Babu, K. S., Srinivas, P. v., & Rao, J. M. (2008). A new sesquiterpene lactone from the roots of *Saussurea lappa*: Structure-anticancer activity study. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 18(14), 4015–4017. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.06.008>
- Rocha, P. dos S. da, Paula, V. M. B., Olinto, S. C. F., dos Santos, E. L., de Picoli Souza, K., & Estevinho, L. M. (2020). Diversity, chemical constituents and biological activities of endophytic fungi isolated from *Schinus terebinthifolius* Raddi. *Microorganisms*, 8(6), 859.
- Rodilla, J. M., Tinoco, M. T., Morais, J. C., Gimenez, C., Cabrera, R., Martín-Benito, D., Castillo, L., & Gonzalez-Coloma, A. (2008). *Laurus novocanariensis* essential oil: Seasonal variation and

- valorization. *Biochemical Systematics and Ecology*, 36(3), 167–176. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2007.09.001>
- Rodríguez-Sánchez, F., & Arroyo, J. (2008). Reconstructing the demise of Tethyan plants: Climate-driven range dynamics of *Laurus* since the Pliocene. *Global Ecology and Biogeography*, 17(6), 685–695. <https://doi.org/10.1111/j.1466-8238.2008.00410.x>
- Rodríguez-Sánchez, F., Guzmán, B., Valido, A., Vargas, P., & Arroyo, J. (2009). Late Neogene history of the laurel tree (*Laurus* L., Lauraceae) based on phylogeographical analyses of Mediterranean and Macaronesian populations. *Journal of Biogeography*, 36(7), 1270–1281. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2009.02091.x>
- Ruiz, J. (2020). Antimicrobial stewardship: a COVID casualty? In *Journal of Hospital Infection* (Vol. 106, Issue 3, pp. 401–403). W.B. Saunders Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2020.10.002>
- Russo, A., Cardile, V., Lombardo, L., Vanella, L., Vanella, A., & Garbarino, J. A. (2005). Antioxidant activity and antiproliferative action of methanolic extract of *Geum quellyon* Sweet roots in human tumor cell lines. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(3), 323–332.
- Salama, H. M. H., & Marraiki, N. (2010). Antimicrobial activity and phytochemical analyses of *Polygonum aviculare* L. (Polygonaceae), naturally growing in Egypt. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 17(1), 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2009.12.009>
- Samavarchi Tehrani, S., Mahmoodzadeh Hosseini, H., Yousefi, T., Abolghasemi, M., Qujeq, D., Maniati, M., & Amani, J. (2019). The crosstalk between trace elements with DNA damage response, repair, and oxidative stress in cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(2), 1080–1105. <https://doi.org/10.1002/jcb.27617>
- Sayyah, M., Saroukhani, G., Peirovi, A., & Kamalinejad, M. (2003). Analgesic and anti-inflammatory activity of the leaf essential oil of *Laurus nobilis* Linn. *Phytotherapy Research*, 17(7), 733–736.
- Sayyah, M., Valizadeh, J., & Kamalinejad, M. (2002). Anticonvulsant activity of the leaf essential oil of *Laurus nobilis* against pentylenetetrazole- and maximal electroshock-induced seizures. *Phytomedicine*, 9(3), 212–216.
- Seifert, F., Todorov, D. K., Hutter, K.-J., & Zeller, W. J. (1996). Cell cycle effects of thaliblastine. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 122(11), 707–710.
- Sengupta, K., Alluri, K. v., Satish, A. R., Mishra, S., Golakoti, T., Sarma, K. V. S., Dey, D., & Raychaudhuri, S. P. (2008). A double blind, randomized, placebo controlled study of the efficacy and safety of 5-Loxin® for treatment of osteoarthritis of the knee. *Arthritis Research and Therapy*, 10(4). <https://doi.org/10.1186/ar2461>
- Seo, C. S., Lim, H. S., Jeong, S. J., & Shin, H. K. (2015). Anti-allergic effects of sesquiterpene lactones from the root of *Aucklandia lappa* Decne. *Molecular Medicine Reports*, 12(5), 7789–7795. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4342>

- Seo, S. H., Lee, S. H., Cha, P. H., Kim, M. Y., Min, D. S., & Choi, K. Y. (2016). Polygonum aviculare L. And its active compounds, quercitrin hydrate, caffeic acid, and rutin, activate the Wnt/ β -catenin pathway and induce cutaneous wound healing. *Phytotherapy Research*, *30*(5), 848–854. <https://doi.org/10.1002/ptr.5593>
- Sequeira, M. M. d., Fontinha, S., Freitas, F., Ramos, L., & Mateus, M. (2006). *Plantas e usos tradicionais nas memórias de hoje. Freguesia da Ilha*. Edição Casa do Povo da Ilha/Parque Natural da Madeira, Portugal. .
- Serina, J., Carvalho, M. J., Weinhold, T., & Castilho, P. C. (2016). Bioactive type A proanthocyanins from fungus *Laurobasidium lauri*. *Planta Medica*, *82*(S 01), P647.
- Sevindik, E., & Okan, K. (2020). Genetic Diversity and Phylogenetic Analyses of *Laurus nobilis* L. (Lauraceae) Populations Revealed Chloroplast (cpDNA) trnL Intron and trnL-F Region. *International Journal of Fruit Science*, *20*(S2), S82–S93. <https://doi.org/10.1080/15538362.2019.1707745>
- Shokr, H., Dias, I. H. K., & Gherghel, D. (2020). Microvascular function and oxidative stress in adult individuals with early onset of cardiovascular disease. *Scientific Reports*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60766-0>
- Sieber, T. N. (2007). Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? In *Fungal Biology Reviews* (Vol. 21, Issues 2–3, pp. 75–89). <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.05.004>
- Sineiro, J., Rubilar, M., Franco, D., & Jablonsky, M. (2008). Polyphenols from plant materials: Extraction and antioxidant power. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 3210–3216.
- Singh, A., Kukreti, R., Saso, L., & Kukreti, S. (2019). Oxidative stress: A key modulator in neurodegenerative diseases. In *Molecules* (Vol. 24, Issue 8). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules24081583>
- Singh, R. P., Sharad, S., & Kapur, S. (2004). Free radicals and oxidative stress in neurodegenerative diseases: relevance of dietary antioxidants. *J Indian Acad Clin Med*, *5*(3), 218–225.
- Slaileh, A., Cruz, A. B., Omar, G., Fares, S., Abdallah, L., Almasri, M., & Zurba, Z. (2013). Antibacterial Activity of Selected Palestinian Wild Plant Extracts against Multidrug-Resistant Clinical Isolate ... Cite this paper Antibacterial Activity of Selected Palestinian Wild Plant Extracts against Multidrug-Resistant Clinical Isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *An International Journal*, *1*(10), 963–969. www.jpronline.info
- Sosa, V., Moliné, T., Somoza, R., Paciucci, R., Kondoh, H., & LLeonart, M. E. (2013). Oxidative stress and cancer: An overview. In *Ageing Research Reviews* (Vol. 12, Issue 1, pp. 376–390). <https://doi.org/10.1016/j.arr.2012.10.004>

- Sun, C. M., Syu, W. J., Don, M. J., Lu, J. J., & Lee, G. H. (2003). Cytotoxic sesquiterpene lactones from the root of *Saussurea lappa*. *Journal of Natural Products*, *66*(9), 1175–1180. <https://doi.org/10.1021/np030147e>
- Sung, Y.-Y., Yoon, T., Yang, W.-K., Kim, S. J., Kim, D.-S., & Kim, H. K. (2013). The antiobesity effect of *Polygonum aviculare* L. ethanol extract in high-fat diet-induced obese mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2013*.
- Süntar, I. (2020). Importance of ethnopharmacological studies in drug discovery: role of medicinal plants. In *Phytochemistry Reviews* (Vol. 19, Issue 5, pp. 1199–1209). Springer Science and Business Media B.V. <https://doi.org/10.1007/s11101-019-09629-9>
- Süntar, I., Küpeli Akkol, E., Tosun, A., & Keleş, H. (2014). Comparative pharmacological and phytochemical investigation on the wound-healing effects of the frequently used essential oils. *Journal of Essential Oil Research*, *26*(1), 41–49. <https://doi.org/10.1080/10412905.2013.820672>
- Taofiq, O., Calhelha, R. C., Heleno, S., Barros, L., Martins, A., Santos-Buelga, C., Queiroz, M. J. R. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). The contribution of phenolic acids to the anti-inflammatory activity of mushrooms: Screening in phenolic extracts, individual parent molecules and synthesized glucuronated and methylated derivatives. *Food Research International*, *76*, 821–827.
- Tasneem, S., Liu, B., Li, B., Choudhary, M. I., & Wang, W. (2019). Molecular pharmacology of inflammation: Medicinal plants as anti-inflammatory agents. In *Pharmacological Research* (Vol. 139, pp. 126–140). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.11.001>
- Tato, L., de Nisi, P., Donnini, S., & Zocchi, G. (2013). Low iron availability and phenolic metabolism in a wild plant species (*Parietaria judaica* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, *72*, 145–153. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.05.017>
- Teles, M., Pinheiro, A., Dias, C., Tavares, J., Barbosa-Filho, J., & da Cunha, E. (2019). Alkaloids of the Lauraceae. In *Alkaloids: Chemistry and Biology* (Vol. 82, pp. 147–304). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.alkal.2018.11.002>
- Tene, V., Malagon, O., Finzi, P. V., Vidari, G., Armijos, C., & Zaragoza, T. (2007). An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchi, Ecuador. *Journal of Ethnopharmacology*, *111*(1), 63–81.
- Tinoco, M. T., Ramos, P., & Candeias, M. F. (2009). Effects of a hexane extract from *Laurus novocanariensis* leaves on the ethanol metabolism of Wistar rats. *Fitoterapia*, *80*(2), 130–133. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2008.12.003>
- Tshibangu, J. N., Wright, A. D., & König, G. M. (2003). HPLC isolation of the anti-plasmodially active bisbenzylisoquinone alkaloids present in roots of *Cissampelos mucronata*. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, *14*(1), 13–22.

- Tunon, H., Olavsdotter, C., & Bohlin, L. (1995). Evaluation of anti-inflammatory activity of some Swedish medicinal plants. Inhibition of prostaglandin biosynthesis and PAF-induced exocytosis. *Journal of Ethnopharmacology*, *48*(2), 61–76.
- Vicente, A. M., Guillén, M. I., Habib, A., & Alcaraz, M. J. (2003). Beneficial effects of heme oxygenase-1 up-regulation in the development of experimental inflammation induced by zymosan. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *307*(3), 1030–1037.
- Villegas, L. F., Fernández, I. D., Maldonado, H., Torres, R., Zavaleta, A., Vaisberg, A. J., & Hammond, G. B. (1997). Evaluation of the wound-healing activity of selected traditional medicinal plants from Peru. *Journal of Ethnopharmacology*, *55*(3), 193–200.
- Villegas, L. F., Marçalo, A., Martin, J., Fernández, I. D., Maldonado, H., Vaisberg, A. J., & Hammond, G. B. (2001). (+)-epi- α -bisbolol is the wound-healing principle of *Peperomia galioides*: Investigation of the in vivo wound-healing activity of related terpenoids. *Journal of Natural Products*, *64*(10), 1357–1359. <https://doi.org/10.1021/np0102859>
- Vitalini, S., Puricelli, C., Mikerezi, I., & Iriti, M. (2015). Plants, people and traditions: Ethnobotanical survey in the Lombard Stelvio National Park and neighbouring areas (Central Alps, Italy). *Journal of Ethnopharmacology*, *173*, 435–458.
- Viveiros, M. M., Barreto, M. C., & Seca, A. M. L. (2022). *Laurus azorica*: Valorization through Its Phytochemical Study and Biological Activities. *Separations*, *9*(8). <https://doi.org/10.3390/separations9080211>
- Wang, P., Henning, S. M., & Heber, D. (2010). Limitations of MTT and MTS-based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols. *PLoS ONE*, *5*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010202>
- Wang, Y., Xu, E., Musich, P. R., & Lin, F. (2019). Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases and the potential countermeasure. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, *25*(7), 816–824.
- Wang, Z., Zhao, X., & Gong, X. (2016). Costunolide induces lung adenocarcinoma cell line A549 cells apoptosis through ROS (reactive oxygen species)–Mediated endoplasmic reticulum stress. *Cell Biology International*, *40*(3), 289–297.
- Wasser, S. P. (2014). Medicinal mushroom science: Current perspectives, advances, evidences, and challenges. In *Biomedical Journal* (Vol. 37, Issue 6, pp. 345–356). Chang Gung Medical Journal. <https://doi.org/10.4103/2319-4170.138318>
- WCVP. (2020). World Checklist of Vascular Plants, version 2.0. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. *Published on the Internet*.
- Wedge, D. E., Galindo, J. C. G., & Macias, F. A. (2000). Fungicidal activity of natural and synthetic sesquiterpene lactone analogs. *Phytochemistry*, *53*(7), 747–757.
- Weller, S. C., & Catalina Triana, A. (2014). Susto. *The Encyclopedia of Clinical Psychology*, 1–3.

- WHO. (2020). Documento de informação técnica sobre água, saneamento, higiene e gestão das águas residuais para prevenir infecções e reduzir a propagação da resistência aos antimicrobianos. *WHO, FAO and OIE*.
- Wiat, C. (2006). *Medicinal plants of Asia and the Pacific*. Humana Press Inc.
- Wilches, I., Jiménez-Castillo, P., Cuzco, N., Clos, M. V., Jiménez-Altayó, F., Peñaherrera, E., Jerves-Andrade, L., Tobar, V., vander Heyden, Y., Leon-Tamariz, F., & Vila, E. (2021). Anti-inflammatory and sedative activities of *Peperomia galioides*: in vivo studies in mice. *Natural Product Research*, *35*(10), 1657–1661. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1622104>
- Wong, F.-C., Yong, A.-L., Ting, E. P.-S., Khoo, S.-C., Ong, H.-C., & Chai, T.-T. (2014). Antioxidant, metal chelating, anti-glucosidase activities and phytochemical analysis of selected tropical medicinal plants. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, *13*(4), 1409.
- Wu, J. Y., Siu, K. C., & Geng, P. (2021). Bioactive ingredients and medicinal values of grifola frondosa (Maitake). In *Foods* (Vol. 10, Issue 1). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/foods10010095>
- Wu, Y.-Z., Zhang, H.-W., Sun, Z.-H., Dai, J.-G., Hu, Y.-C., Li, R., Lin, P.-C., Xia, G.-Y., Wang, L.-Y., & Qiu, B.-L. (2018). Bysspectin A, an unusual octaketide dimer and the precursor derivatives from the endophytic fungus *Byssochlamys spectabilis* IMM0002 and their biological activities. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *145*, 717–725.
- Yang, M., Ding, J. H., & Jiang, R. (2015). Effects of Extracts from *Polygonum aviculare* L. Against some Agricultural Pests. In *Egyptian Journal of Biological Pest Control* (Vol. 25, Issue 2).
- Yang, X., Gao, X., Cao, Y., Guo, Q., Li, S., Zhu, Z., Zhao, Y., Tu, P., & Chai, X. (2018). Anti-inflammatory effects of boldine and reticuline isolated from *Litsea cubeba* through JAK2/STAT3 and NF- κ B signaling pathways. *Planta Medica*, *84*(01), 20–25.
- Yin, M. H., Kang, D. G., Choi, D. H., Kwon, T. O., & Lee, H. S. (2005). Screening of vasorelaxant activity of some medicinal plants used in Oriental medicines. *Journal of Ethnopharmacology*, *99*(1), 113–117.
- Yoshikawa, M., Shimoda, H., Uemura, T., Morikawa, T., Kawahara, Y., & Matsuda, H. (2000). Alcohol Absorption Inhibitors from Bay Leaf (*Laurus nobilis*): Structure-Requirements of Sesquiterpenes for the Activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *8*, 2071–2077.
- Yu, G., Xiao, C.-L., Lu, C.-H., Jia, H.-T., Ge, F., Wang, W., Yin, X.-F., Jia, H.-L., He, J.-X., & He, Q.-Y. (2011). Phosphoproteome profile of human lung cancer cell line A549. *Molecular BioSystems*, *7*(2), 472–479.
- Yuan, S., Gopal, J. V., Ren, S., Chen, L., Liu, L., & Gao, Z. (2020). Anticancer fungal natural products: Mechanisms of action and biosynthesis. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *202*, 112502.
- Zhang, X., Zhang, T., Ren, X., Chen, X., Wang, S., & Qin, C. (2021). Pyrethroids toxicity to Male reproductive system and offspring as a function of oxidative stress induction: Rodent studies. *Frontiers in Endocrinology*, *12*, 656106.

Zhao, L., Zhou, T., Yan, F., Zhu, X., Lu, Q., & Liu, R. (2019). Synergistic inhibitory effects of procyanidin B2 and catechin on acrylamide in food matrix. *Food Chemistry*, 296, 94–99.

7. Anexos

Anexo 1 – Amostra do fungo de Madre-de-Louro (*Laurobasidium lauri*) desidratado, adquirida numa loja tradicional. (fotografia captada pela autora)



Anexo 2 – Amostras das plantas desidratadas adquiridas numa loja tradicional. Da esquerda para a direita: Sempre-noiva (*Polygonum aviculare*) (1), Canela-branca (*Peperomia galioides*) (2). Em baixo: Alfavaca (*Parietaria judaica*) (3). (fotografias captadas pela autora).

