

Biological activity screening of seven *Plectranthus* species

Pesquisa de actividade biológica de sete espécies de Plectranthus

Epole Ntungwe N.¹, Joana Marçalo¹, Catarina Garcia¹, Catarina Reis², Catarina Teodósio¹, Carolina Oliveira¹, Cláudia Oliveira¹, Amílcar Roberto¹, Patrícia Rijo^{1,2*}

¹ CBIOS - Research Center for Biosciences & Health Technologies, U. Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Campo Grande 376, 1749-024 Lisboa, Portugal

² Instituto de Investigação do Medicamento (iMed.Ulisboa), Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, 1649-003 Lisboa, Portugal

Email: patricia.rijo@ulusofona.pt

Abstract

Natural products from *Plectranthus* spp. plants have an ethnopharmacological use, inspiring several scientific investigations. As such, this work aims to perform a biological activity screening in order to scientifically validate the use of these plants. Assays on in vitro acetylcholinesterase (AChE) inhibition, antioxidant effects, antimicrobial activity and *Artemia salina* lethality were performed on seven *Plectranthus* spp. extracts (*P. swynnertonii*, *P. welwischii*, *P. woodii*, *P. cylindraceus*, *P. spicatus*, *P. ramosior* and *P. petiolaris*). Acetonic extracts were obtained by sonication (10% w/v), where *P. ramosior* had the highest yield of dry extract (13.49% w/w). In the AChE inhibition assay, only *P. cylindraceus* extract decreased enzymatic activity ($30.2 \pm 3.78\%$). The antimicrobial activity was screened using the well diffusion method, against Gram positive and negative bacteria and yeast. *P. ramosior* extract showed not only an inhibition zone against *S. aureus* and *C. albicans* (15 and 11 mm, respectively), but also the highest scavenging activity (DPPH method, $36.4 \pm 0.04\%$). On the lethality test in *A. salina*, *P. swynnertonii* extract was the most toxic ($LC_{50} = 0.036$ mg/L). These preliminary results showed that *P. cylindraceus*, *P. ramosior* and *P. swynnertonii* are potential bioactive extracts for further isolation and antimicrobial and cytotoxic studies.

Keywords: *Plectranthus*, Acetylcholinesterase, Antioxidant, Antimicrobial, Toxicity

Resumo

Os produtos naturais das espécies de plantas *Plectranthus* têm um uso etnofarmacológico, suscitando vários estudos científicos. Neste trabalho pretendeu-se validar cientificamente estas plantas, realizando uma pesquisa de atividades biológicas. Extratos de sete espécies de *Plectranthus* (*P. swynnertonii*, *P. welwischii*, *P. woodii*, *P. cylindraceus*, *P. spicatus*, *P. ramosior* e *P. petiolaris*) foram testados na inibição da acetilcolinesterase in vitro (AChE), atividades antioxidante e antimicrobiana, e toxicidade em *Artemia salina*. Os extratos acetónicos foram obtidos por ultrassons (10% m/v), dos quais *P. ramosior* obteve o rendimento de extração mais elevado (13,49% m/m). Todos os extratos foram testados, no entanto apenas o *P. cylindraceus* obteve inibição da atividade da AChE ($30,2 \pm 3,78\%$). A atividade antimicrobiana foi avaliada usando o método de difusão em poços, contra bactérias Gram-positivas, -negativas e leveduras. *P. ramosior* revelou não só inibição contra *S. aureus* e *C. albicans* (15 e 11 mm, respetivamente), como também a mais elevada atividade antioxidante (método DPPH, $36,4 \pm 0,04\%$). No ensaio em *A. salina* *P. swynnertonii* foi o extrato mais tóxico ($LC_{50} = 0,036$ mg/L).

Os resultados preliminares obtidos neste trabalho, revelam a potencial biotividade dos extratos de *P. cylindraceus*, *P. ramosior* e *P. swynnertonii*, sugerindo o posterior isolamento dos compostos bioativos, e continuidade dos estudos antimicrobianos e citotóxicos.

Palavras chave: *Plectranthus*, Acetilcolinesterase, Antioxidante, Antimicrobiana, Toxicidade

Introduction

Plectranthus L' Her. genus belongs to the Lamiaceae family together with other commercially important plant genera, such as, *Salvia*, *Ocimum* or *Mentha*, with a rich diversity of ethnobotanical uses in traditional medicine ^(1,2). The scientific validation on the traditional medicine of these plants is an important issue, to search for pharmacological activities and through drug development. In fact, there has been an increasing interest on the *Plectranthus* genus for the investigation of its therapeutic values ^(3,4). Regarding this, the herein described study evaluated several biological activities of seven *Plectranthus* species (*P. swynnertonii* S. Moore, *P. welwischii* Briq. Codd, *P. woodii* Gürke, *P. cylindraceus* Hochst ex Benth, *P. spicatus* E. Mey ex Benth, *P. ramosior* Benth. Van Jaarsv., and *P. petiolaris* E. Mey ex Benth, Druce).

According to the references of this study, scientific information on the analyzed *Plectranthus* spp. is scarce and with no phytochemical studies (except for *P. cylindraceus*). To the best of our knowledge, this is the first report comprising the evaluation of acetylcholinesterase inhibition, antioxidant and antimicrobial activities, as well as the *Artemia salina* lethality assay of the seven *Plectranthus* species.

Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia, a progressive neurodegenerative disorder associated with memory and cognition impairment, that remains until the end of the patient life ⁽⁵⁾. Reversible inhibition of the acetylcholinesterase (AChE) enzyme is considered as one of the prime therapeutic strategies for the treatment of AD ^(6,7). Eserine, tacrine, donepezil, rivastigmine and galanthamine are the only drugs currently approved for the treatment of AD; however, these drugs are known to have severe side effects for frequent clinical use ⁽⁸⁾. Therefore, there is an urgent need to search for new drugs. *Plectranthus* spp. could be an important source to find novel compounds that can simultaneously protect neurons from oxidative stress and selectively inhibit AChE.

Humans are often exposed to free radicals which are generated from normal metabolic processes in the body. Free radicals are not always harmful, however, high level of free radicals may disturb the normal cellular mechanism by inducing oxidative damage to DNA, protein and lipids which ultimately result in chromosomal instability and mutation ⁽⁹⁾. Moreover, overproduction of free radicals may reduce the potency of the biological defense system to detoxify these radicals which result in oxidative stress. The oxidative stress might play a role in the risk of development of several metabolic

Introdução

O género *Plectranthus* L' Her. pertence à família Lamiaceae juntamente com outros géneros de plantas comercialmente importantes, como *Salvia*, *Ocimum* ou *Mentha*, que possuem uma diversidade rica de usos etnobotânicos na medicina tradicional ^(1,2). A procura de atividades farmacológicas até o desenvolvimento de fármacos, através da validação científica da medicina tradicional destas plantas é um assunto importante. Na verdade, tem havido um aumento na pesquisa de interesses terapêuticos do género *Plectranthus* ^(3,4). Assim, no presente estudo são descritas várias atividades biológicas de sete espécies de *Plectranthus* (*P. swynnertonii* S. Moore, *P. welwischii* Briq. Codd, *P. woodii* Gürke, *P. cylindraceus* Hochst ex Benth, *P. spicatus* E. Mey ex Benth, *P. ramosior* Benth. Van Jaarsv., e *P. petiolaris* E. Mey ex Benth, Druce).

De acordo com as referências deste estudo, as informações científicas sobre *Plectranthus* spp. são escassas, e sem estudos fitoquímicos (exceto para *P. cylindraceus*). Tanto quanto é do nosso conhecimento, este é o primeiro relatório que inclui a avaliação da inibição da acetilcolinesterase, atividades antioxidantes e antimicrobianas, bem como o ensaio de letalidade de *Artemia salina* das sete espécies de *Plectranthus*.

A doença de Alzheimer (AD) é a causa mais comum de demência, um distúrbio neurodegenerativo progressivo associado à perda de memória e cognição, que permanece até o final da vida do paciente ⁽⁵⁾. A inibição reversível da enzima acetilcolinesterase (AChE) é considerada como uma das principais estratégias terapêuticas para o tratamento da AD ^(6,7). Os únicos fármacos aprovados atualmente para o tratamento da AD são a eserina, tacrina, donepezilo, rivastigmina e galantamina. No entanto, estes fármacos são conhecidos por terem efeitos secundários graves em uso clínico frequente ⁽⁸⁾. Assim sendo, há uma urgente necessidade de procurar novos medicamentos. As *Plectranthus* spp. podem ser uma fonte essencial para encontrar novos compostos, que possam simultaneamente proteger os neurónios contra o stress oxidativo e inibir seletivamente a AChE. Os seres humanos são frequentemente expostos a radicais livres que são gerados a partir de processos metabólicos normais no corpo. Os radicais livres nem sempre são prejudiciais, no entanto, o alto nível de radicais livres pode perturbar o mecanismo celular normal, induzindo danos oxidativos ao DNA, proteínas e lipídios que, em última análise, resultam em instabilidade cromossômica e mutações ⁽⁹⁾. Além disso, a superprodução de radicais livres pode reduzir a potência do sistema de defesa biológico para desintoxicar estes radicais, re-

diseases such as cancer, cardiovascular diseases, diabetes, obesity, neurodegenerative and ageing-related disorders^(9,10). Regarding the antioxidant properties of the Lamiaceae family and future phytochemical evaluation of active compounds, there are several related reports of *Plectranthus* spp. extracts that suggest these plants as an important study motif⁽³⁾.

The antimicrobials of natural origin usually present complex chemical structures, which may be important for specific interactions and recognition of potential macromolecular targets in the pathogenic microorganisms. These active natural products are, generally, secondary plant metabolites biosynthesized to fight and prevent the proliferation of plant pathogenic microorganisms⁽¹¹⁾. Some species of the *Plectranthus* genus have ethnopharmacological applications, with antimicrobial activity often cited. Indeed, it is known that both the metabolites and extracts of several *Plectranthus* spp. have exhibited activity against Gram-positive and Gram negative bacteria and yeasts⁽¹²⁻¹⁴⁾.

Brine shrimp lethality assay is a technique commonly used to investigate the toxic potential of plant extracts⁽¹⁵⁾. This is based on cellular mechanisms that may occur via necrosis, characterised by loss of membrane integrity, death of cell or apoptosis, a genetic program of controlled cell death⁽¹⁶⁾. Brine Shrimp Lethality Assay (BSLA) has been applied as an alternative bioassay technique to screen the toxicity of plant extracts, toxicity of heavy metals and metal ions, toxicity of cyanobacteria and algae, cytotoxicity of dental materials, toxicity of nanoparticles, as well as screening of marine natural products⁽¹⁷⁾. This test is economical and utilises small amount of test material^(18,19). The present study was therefore designed to evaluate the potential toxicity (using *A. salina*) of the seven *Plectranthus* spp.

Methods and Materials

Chemicals: Acetone, dimethyl sulfoxide (DMSO) and acetylcholine iodide (Sigma). Tacrine, HEPES buffer and Ellman reagent (Fluka Chemie AG). Mueller-Hinton and *Sabouraud dextrose Agar*, vancomycin, norfloxacin, nystatin, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), Quercetin, Butylated hydroxytoluene (BHT),

sultando no *stress* oxidativo. O *stress* oxidativo pode ter um papel crucial no risco de desenvolvimento de várias doenças metabólicas como cancro, doenças cardiovasculares, diabetes, obesidade, distúrbios neurodegenerativos e doenças associadas ao envelhecimento^(9,10). Vários estudos têm vindo a avaliar os extratos de *Plectranthus* spp. tendo em conta as suas propriedades antioxidantes e futura avaliação fitoquímica de compostos ativos, transformando estas plantas num importante motivo de estudo⁽³⁾.

Os compostos antimicrobianos de origem natural geralmente apresentam estruturas químicas complexas que podem ser importantes nas interações específicas e reconhecimento de alvos macromoleculares potenciais, nos microrganismos patogénicos. Estes produtos naturais ativos são, em geral, metabolitos secundários vegetais biosintetizados para combater e prevenir a proliferação de microrganismos patogénicos das plantas⁽¹¹⁾. Algumas espécies do género *Plectranthus* têm aplicações etnofarmacológicas com atividade antimicrobiana frequentemente citada. De facto, sabe-se que tanto os metabolitos como os extratos de várias *Plectranthus* têm demonstrado atividade contra bactérias Gram-positivas e negativas e leveduras⁽¹²⁻¹⁴⁾.

O ensaio de letalidade em *Artemia salina* é uma técnica usual para avaliar o potencial tóxico de extratos vegetais⁽¹⁵⁾. Este ensaio é baseado no mecanismo celular que pode ocorrer através de necrose, caracterizada pela perda da integridade da membrana, morte da célula ou apoptose, um programa genético de morte celular controlada⁽¹⁶⁾. O ensaio de letalidade em *A. salina* (BSLA) tem vindo a ser aplicado como uma técnica alternativa de bioensaio para examinar a toxicidade de extratos de plantas, toxicidade de metais pesados e iões metálicos, toxicidade de cianobactérias e algas, citotoxicidade de materiais dentários, toxicidade de nanopartículas, bem como no rastreio de produtos marinhos naturais⁽¹⁷⁾. Este teste é económico e necessita apenas de uma pequena quantidade de amostra^(18,19). O presente estudo foi portanto concebido para avaliar a potencial toxicidade (utilizando o modelo de *A. salina*) das sete espécies de *Plectranthus*.

Métodos

Reagentes: Acetona, dimetilsulfóxido (DMSO) e iodeto de acetilcolina (Sigma). Tacrina, tampão HEPES e reagente de Ellman (Fluka Chemie AG). Agar Mueller-Hinton e *Sabouraud Dextrose*, vancomicina, norfloxacin, nistatina, 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), quercetina, hidroxitolueno butilado (BHT), metanol,

Methanol, JBL *Artemia* salt, JBL *Artemia* eggs (JBL GmbH and Co. KG, D-67141 Neuhofen Germany).

Equipment: Rotary evaporator (K Ika-WERKE, GMBH \$ CO.KG; D-79219 Staufen Germany), spectrophotometer U-1500 Hitachi Instruments, Inc USA., microscope (Æ, CETI Belgium), 24 well microplates, aquarium air pump (HI-FLO™ Single Type 4000), Thermostat Cabinet AQUA LYTIC®, TLC silica gel 60F₂₅₄ 20x20(Merck KGaA), Whatman, Inc., Clifton, NJ, USA and ultrasound apparatus from VWR.

Plant material

All plant materials of *Plectranthus swynnertonii* S. Moore, *P. welwischii* (Briq. Codd), *P. woodii* Gürke, *P. cylindraceus* Hochst, ex Benth, *P. spicatus* E. Mey ex Benth., *P. ramosior* Benth. Van Jaarsv., *P. petiolaris* E. Mey ex Benth, Druce were grown in the Parque Botânico da Tapada da Ajuda from cuttings provided by the Kirstenbosch National Botanical Gardens, South Africa, and were collected between 2007 and 2008, always in June and September, and voucher specimens were deposited in the Herbarium “João de Carvalho e Vasconcellos” of the “Instituto Superior de Agronomia”, Lisboa (LISI), Portugal.

Microorganisms

Enterococcus faecalis ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 2601 and *Candida albicans* ATCC 10231.

Extract preparation

Plant extracts were prepared by a sonication extraction method (10 % (w/v)). This was performed by adding 30 mL of acetone to 3 g of grinded dry plant leaves three times, sonicating for 1 hour for each extraction, and filtering (Whatman N° 5 paper, Inc., Clifton, NJ, USA.)⁽¹⁴⁾ after each sonication. The liquid samples were evaporated using a rotary evaporator at 40-50°C. The extracts were prepared at the concentration of 10 mg/mL in DMSO. The extraction yield (% w/w) for each of the extracts was determined (**Equation 1**).

$$\text{Equation 1: \% Yield (w/w)} = \frac{\text{Weight of extract (g)}}{\text{Weight of dried plant (g)}} \times 100$$

$$\text{Equação 1: \% Rendimento (m/m)} = \frac{\text{Resíduo seco (g)}}{\text{Planta seca (g)}} \times 100$$

JBL *Artemia* salt, JBL *Artemia* eggs (JBL GmbH e Co. KG, D-67141 Neuhofen Alemanha).

Equipamento: Evaporador rotativo (K Ika-WERKE, GMBH \$ CO.KG; D-79219 staufen Alemanha), Espectrofotômetro U-1500 Hitachi Instruments, Inc USA., Microscópio óptico (Æ, CETI Bélgica), microplacas de 24 poços, Bomba de ar de aquário (HI-FLO™ Single Type 4000), Armário com termóstato AQUA LYTIC®, sílica gel de TLC 60F₂₅₄ 20x20(Merck KGaA), Whatman, Inc., Clifton, NJ, USA e aparelho de ultrassons da VWR.

Material vegetal

Todo o material das plantas *Plectranthus swynnertonii* S. Moore, *P. welwischii* (Briq. Codd), *P. woodii* Gürke, *P. cylindraceus* Hochst, ex Benth, *P. spicatus* E. Mey ex Benth., *P. ramosior* Benth. Van Jaarsv. e *P. petiolaris* E. Mey ex Benth, Druce cresceu no Parque Botânico da Tapada da Ajuda, provenientes de porções de caules vindos do “Kirstenbosch National Botanical Gardens”, África do Sul, e foi recolhido entre 2007 e 2008, sempre em Junho e Setembro e variados espécimes foram plantados no Herbário “João de Carvalho e Vasconcelos” do “Instituto Superior de Agronomia”, Lisboa (LISI), Portugal.

Microorganismos

Enterococcus faecalis ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 2601 e *Candida albicans* ATCC 10231.

Preparação dos extratos

Os extratos das plantas foram preparados utilizando um método de extração por ultrassons (10 % (m/v)). Adicionaram-se 30 mL de acetona a 3 g de folhas trituradas de planta seca, três vezes durante 1 hora cada extração, e filtrou-se usando filtros Whatman papel N° 5 (Whatman, Inc., Clifton, NJ, USA.)⁽²⁰⁾. Os extratos obtidos foram evaporados usando o evaporador rotativo a 40-50 °C. O extratos foram depois colocados em Eppendorfs e dissolvidos em DMSO a uma concentração de 10 mg/mL. O rendimento de extração foi determinado para cada um dos extratos (**Equação 1**).

In vitro Acetylcholinesterase inhibition

Acetylcholinesterase enzymatic activity was evaluated in accordance with the method described by Rijo *et al.*,⁽²⁰⁾ using a microplate reader. All tests were carried out in triplicate with tacrine as the positive control. The acetonic extracts were tested at a concentration of 0.1 µg/mL, and the inhibition percentage values were calculated according to **Equation 2** and **3**.

$$\text{Equation 2: Velocity reaction of control or inhibitor} = \frac{\text{Corrected absorbance (nm)}}{\text{Time (min)}}$$

$$\text{Equação 2: Velocidade da reação do controle ou inibidor} = \frac{\text{Absorvência corrigida (nm)}}{\text{Tempo (min)}}$$

$$\text{Equation 3: Inhibition (\%)} = 100 - \left(\frac{100 \times \text{Velocity reaction of inhibitor}}{\text{Velocity reaction of control}} \right)$$

$$\text{Equação 3: Inibição (\%)} = 100 - \left(\frac{100 \times \text{Velocidade da reação do inibidor}}{\text{Velocidade da reação controle}} \right)$$

Antimicrobial activity: Well Diffusion Method

The antimicrobial activity of each prepared extract was evaluated against two Gram-positive bacteria (*E. faecalis* and *S. aureus*), two Gram-negative bacteria (*E. coli* and *P. aeruginosa*) and two yeasts (*S. cerevisiae* and *C. albicans*). Previously prepared extracts as described previously were reconstituted in DMSO at 1 mg/mL concentration. Stock solutions of reference antibiotics (vancomycin, norfloxacin and nystatin) were also prepared at 1 mg/mL in DMSO.

In aseptic conditions, Petri dishes containing 20 mL of solid Mueller-Hinton, or *Sabouraud Dextrose Agar* culture medium for yeasts, were inoculated with 0.1 mL of bacterial suspension matching a 0.5 McFarland standard solution and uniformly spread on the medium surface using a sterile swab. Wells of approximately 5 mm in diameter were made in the medium, using a sterile glass Pasteur pipette, and 50 µL of each extract were added into the wells. A positive control of vancomycin for Gram-positive bacteria, norfloxacin for Gram-negative bacteria and nystatin for yeasts and a negative control of DMSO were used in the assay. Plates were incubated at 37 °C for 24 hours. The antimicrobial activity was evaluated by measuring the diameter (mm) of the inhibition zone formed around the wells and compared to controls⁽⁴⁾.

Atividade da acetilcolinesterase in vitro

A atividade enzimática da acetilcolinesterase foi avaliada de acordo com o método descrito por Rijo *et al.*,⁽²⁰⁾ usando um leitor de microplacas (**Secção 2.2**). Todos os testes foram executados em triplicado usando tacrina como controle positivo. Os extratos das plantas foram testados a uma concentração de 0,1 µg/mL de acordo com as equações em **Equação 2 e 3**.

Atividade antimicrobiana: Método de difusão em poços

A atividade antimicrobiana de cada extrato preparado foi avaliada contra seis espécies bacterianas e leveduras obtidas de “American Type Culture Collection” (ATCC), nomeadamente *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 2601 e *Candida albicans* ATCC 10231. O ensaio de difusão em poços foi usado para selecionar os extratos com atividade antimicrobiana.

Os extratos preparados anteriormente de acordo com o descrito na secção **2.5** foram reconstituídos em DMSO a uma concentração de 1 mg/mL. As soluções *stock* dos antibióticos de referência (vancomicina, norfloxacin e nistatina) foram também preparadas a uma concentração de 1 mg/mL em DMSO.

Em condições assépticas, as caixas de Petri que continham 20 mL de meio de cultura de Agar Mueller-Hinton sólido e *Sabouraud Dextrose* (para as leveduras) foram inoculadas com 0,1 mL de suspensão bacteriana de acordo com a escala 0,5 da solução de McFarland e a suspensão foi uniformemente espalhada na superfície do meio usando um cotonete estéril. Foram feitos poços com aproximadamente 5 mm de diâmetro no meio com uma pipeta de Pasteur de vidro esterilizada, e foram co-

Determination of Antioxidant Activity (DPPH)

The antioxidant activity of all extracts was measured by DPPH method, as described by Rijo *et al.* (20) 10 µL of each extract sample were added to a 990 µL solution of DPPH (0.002% in methanol). The mixture was incubated for 30 minutes at room temperature. The absorbance was measured at 517 nm against a corresponding blank and the antioxidant activity was calculated using **Equation 4**.

$$\text{Equation 4: AA (\%)} = \frac{A \text{ DPPH} - A \text{ sample}}{A \text{ DPPH}} \times 100$$

$$\text{Equação 4: AA (\%)} = \frac{A \text{ DPPH} - A \text{ amostra}}{A \text{ DPPH}} \times 100$$

AA is the antioxidant activity, A DPPH is the absorption of DPPH against the blank and A sample is the absorption of the extract or control against the blank. Tests were carried out in triplicate at a sample concentration at 1 mg of dry plant extract/mL. The reference standard used for this procedure was quercetin, used in the same conditions as the samples.

Brine shrimp lethality bioassay

In order to evaluate the toxicity of the different extracts, a test of lethality to *Artemia salina* brine shrimp was performed (18). Concentrations of 10 ppm of each extract were tested. The number of dead larvae was recorded after 24 hours and used to calculate the lethal concentration (%), according to **Equation 5**.

$$\text{Equation 5: Lethal concentration (\%)} = \frac{\text{Total nauplii} - \text{Alive nauplii}}{\text{Total nauplii}}$$

$$\text{Equação 5: Concentração letal (\%)} = \frac{\text{Náuplios totais} - \text{Náuplios vivos}}{\text{Náuplios totais}}$$

locados 50 µL de cada extrato nesses poços. O controlo positivo usado foi a vancomicina para bactérias Gram-positivas, a norfloxacin para bactérias Gram-negativas, a nistatina para fungos e leveduras e o controlo negativo usado foi o DMSO. As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 horas. A atividade antibacteriana foi avaliada por medição do diâmetro (mm) da zona de inibição formada à volta dos poços e comparando-os com o diâmetro dos controlos observados.

Determinação da atividade antioxidante (DPPH)

Para avaliar a capacidade de recaptação de radicais do extrato, foi usado o método do DPPH (20). Foram adicionados 10 µL de extrato de planta (amostra) a 990 µL de solução de DPPH (0,002% em metanol). A mistura foi incubada durante 30 minutos à temperatura ambiente. A absorvência foi medida a 517 nm contra o correspondente branco e a atividade antioxidante foi calculada de acordo com a **Equação 4**:

Em que AA é a atividade antioxidante, A DPPH é a absorvência do DPPH contra o branco e A amostra é a absorvência do extrato ou controlo contra o branco. Os testes foram feitos em triplicado. Os extratos foram testados a uma concentração final de 10 µg/mL.

Bioensaios de letalidade em Artemia salina

Com o objetivo de avaliar a toxicidade dos diferentes extratos foi realizado um teste de letalidade usando o modelo *Artemia salina* (18). Foram testadas concentrações de 10 ppm de cada extracto. O número de larvas mortas foi registado após 24h e utilizado para calcular a percentagem (%) de concentração letal, de acordo com a **Equação 5**.

Results

Extraction yield: Seven *Plectranthus* species were used in this study. The amount of dry extract weight of each *Plectranthus* species is presented in **Figure 1**. *P. ramosior* had the highest extraction yield (13.49 % w/w), followed by *P. petiolaris* while *P. welwischii* had the least extraction yield (3.59 % w/w).

In vitro Acetylcholinesterase inhibition: The AChE percentage inhibition was evaluated in all extracts at a concentration of 1 mg/mL, and once more *P. cylindraceus* ($30.2 \pm 3.78\%$ inhibition) extract was the most active, as is shown in **Figure 2**.

Os extratos ativos (acima dos 40 %) foram novamente testados às concentrações de 0.1, 0.5 e 1 ppm. O número de larvas mortas foi registrado e usado para calcular a Concentração Letal, 50% (LC_{50}) que foi determinada após 24 horas e a contagem foi feita usando um microscópio. Os valores de LC_{50} menores ou iguais a 1 ppm foram considerados ativos.

Resultados

Rendimento: Sete espécies do género *Plectranthus* foram usadas neste estudo. A quantidade dos extratos secos de cada uma das espécies de *Plectranthus* está apresentada na **Figura 1**. *P. ramosior* teve a maior rendimento de extração (13,49% m/m), seguido pelo *P. petiolaris* enquanto que o *P. welwischii* obteve o resultado mais baixo (3,59 % m/m).

Inibição da acetilcolinesterase in vitro: A inibição de AChE foi avaliada em todos os extratos (1 mg/mL), e uma vez mais o extrato *P. cylindraceus* ($30,2 \pm 3,78\%$ inibição) foi o mais ativo, como representado na **Figura 2**.

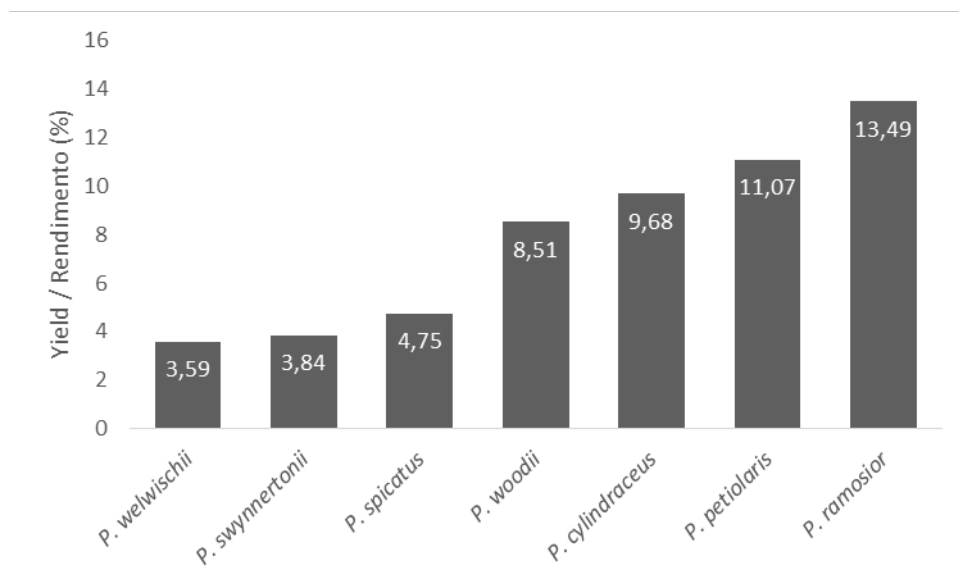


Figure 1 / Figura 1- Percentage yield (dry weight % w/w) of seven *Plectranthus* species / Rendimento (resíduo seco % m/m) das sete espécies de *Plectranthus*.

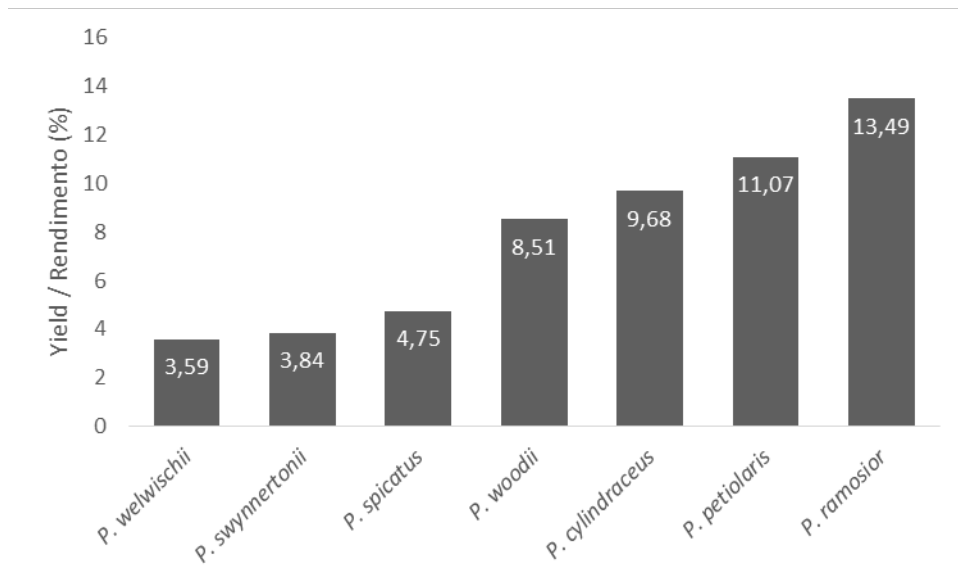


Figure 2 / Figura 2 - Acetylcholinesterase (AChE) percentage inhibition for seven *Plectranthus* species at 1 mg/mL / Percentagem de inibição da acetilcolinesterase (AChE) para as sete espécies de *Plectranthus* a 1 mg/mL.

Antimicrobial activity: The antimicrobial activity of the extracts was evaluated by the well diffusion method. Considering all extracts, the acetonic extract of *P. ramosior* obtained was the more bioactive. *P. ramosior* was active against both *S. aureus* and *C. albicans* (**Table 1**). None of the extracts showed significant antibacterial activity against Gram-negative bacteria with inhibition zones identical to that obtained with the negative control DMSO (5 mm).

Antioxidant activity (DPPH assay)

The antioxidant activity of the *Plectranthus* spp. acetonic extracts in study was evaluated using the DPPH method. The antioxidant activity of the extracts was qualitatively determined using the DPPH radical assay in TLC⁽¹⁴⁾ and all the extracts studied yielded positive results. The extracts were then quantified, and *P. ramosior* showed the highest scavenging activity (36.24 %) and *P. spicatus* the least (10.57 %) (**Figure 3**).

Brine shrimp lethality bioassay

In this study, *Artemia salina* model was preliminary used to assess the toxicity of all extracts⁽¹⁹⁾. Only three of the extracts were toxic to *A. salina*, as shown in **Figure 4**. The active extracts (LC above 40 %) were further determined at concentrations of 0.1, 0.5 and 1 ppm. The number of dead larvae was recorded and used to calculate the Lethal Concentration, 50% (LC₅₀), after 24 h. LC₅₀ values less than or equal to 1 ppm were considered active (**Table 2**).

Atividade antimicrobiana: A atividade antimicrobiana dos extratos foi avaliada pelo método de difusão em poços. Considerando todos os extratos, o extrato de *P. ramosior* obtido foi o mais bioativo. *P. ramosior* foi ativo contra *S. aureus* e *C. albicans* (**Tabela 1**). Nenhum dos extratos mostrou atividade antibacteriana significativa contra bactérias Gram-negativas com zonas de inibição idênticas às obtidas com o controle negativo DMSO (5 mm).

Atividade antioxidante:

A atividade antioxidante dos extratos de *Plectranthus* foi avaliada pelo método de DPPH. A atividade antioxidante dos extratos foi qualitativamente determinada utilizando o ensaio de radical DPPH em TLC⁽¹²⁾ e todos os extratos estudados produziram resultados positivos. Os extratos foram então quantificados e extrato de *P. ramosior* apresentou a maior atividade antioxidante (36.24%) enquanto que o *P. spicatus* obteve o resultado menor (10.57%) (**Figura 3**).

Bioensaio da letalidade em *Artemia salina*:

O modelo de *A. salina* foi utilizado preliminarmente para avaliar a toxicidade de todos os extratos neste estudo⁽¹⁹⁾. Apenas três dos extratos foram considerados tóxicos para *A. salina*, como mostrado na **Figura 4**. Os extratos ativos (LC acima de 40%) foram adicionalmente determinados a concentrações de 0,1; 0,5 e 1 ppm. O número de náuplios mortos foi registrado e utilizado para calcular a Concentração Letal, 50% (LC₅₀), após 24 horas. Valores de LC₅₀ inferiores ou iguais a 1 ppm foram considerados ativos (**Tabela 2**).

Table 1/ Tabela 1 - Antimicrobial activity of the acetonic extracts obtained by the well diffusion method (mm) / Atividade antimicrobiana dos extratos acetônicos, obtida pelo método de difusão em poços (mm).

	<i>Gram -</i>		<i>Gram +</i>		<i>Yeast/Leveduras</i>	
	<i>Pa</i>	<i>Ec</i>	<i>Sa</i>	<i>Ef</i>	<i>Sc</i>	<i>Ca</i>
<i>Positive control/</i> <i>Controlo positivo</i>	32	33	21	20	29	29
<i>Negative control/</i> <i>Controlo negativo</i>	5	5	5	5	5	5
<i>P. spicatus</i>	5	5	5	5	5	5
<i>P. cylindraceus</i>	5	5	5	5	5	5
<i>P. swynnertonii</i>	5	5	5	5	5	5
<i>P. petiolaris</i>	5	5	5	5	5	5
<i>P. ramosior</i>	5	5	15	5	5	11
<i>P. welwischii</i>	5	5	5	5	5	5
<i>P. woodii</i>	5	5	5	5	5	5

Pa – *Pseudomonas aeruginosa*; *Ec* – *Escherichia coli*; *Sa* – *Staphylococcus aureus*; *Ef* – *Enterococcus faecalis*; *Sc* – *Saccharomyces cerevisiae*; *Ca* – *Candida albicans*.

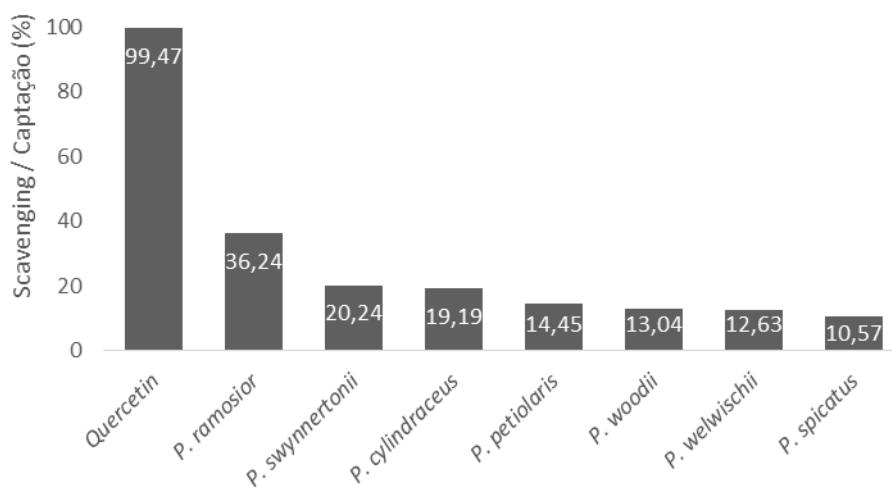


Figure 3 / Figura 3 - Antioxidant activity of extracts under study tested at a concentration of 10 µg/mL / Atividade antioxidante dos extratos em estudo tesados à concentração de 10 µg/mL.

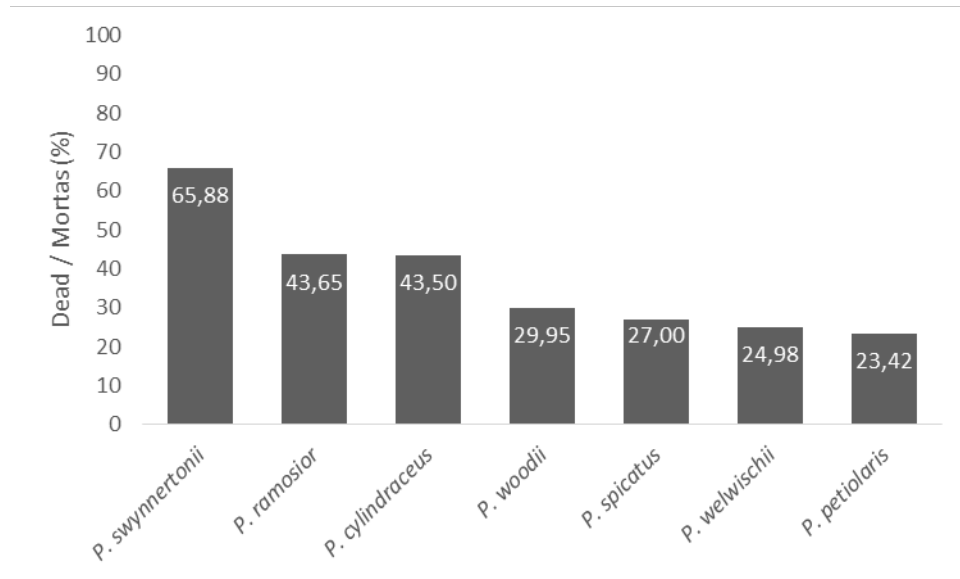


Figure 4 / Figura 4 - Screening of seven *Plectranthus* spp. extracts for toxicity at a concentration of 10 ppm using the *Artemia salina* test /
 Pesquisa de atividade de extratos de sete espécies de *Plectranthus* para toxicidade à concentração de 10 ppm usando o teste de *Artemia salina*.

Table 2 / Tabela 2 - LC₅₀ values (mg/L) for the most active extracts using the *Artemia salina* test /
 Valores de LC₅₀ (mg/L) para os extratos mais ativos usando o teste de *Artemia salina*.

<i>Extracts/Extratos</i>	<i>LC₅₀ (mg/L)</i>
<i>P. ramosior</i>	0,88
<i>P. cylindraceus</i>	0,504
<i>P. swynnertonii</i>	0,036

Discussion

In the present study, the acetylcholinesterase inhibition, antioxidant and antimicrobial activities and *Artemia salina* toxicity of seven *Plectranthus* spp. (*P. swynner-tonii*, *P. welwischii*, *P. woodii*, *P. cylindraceus*, *P. spicatus*, *P. ramosior* and *P. petiolaris*) were investigated. The acetonetic extracts of the seven *Plectranthus* species were prepared using an ultrasound-assisted extraction method. Yields of extraction were determined for all prepared extracts, and the *P. ramosior* acetonetic extract revealed higher yields (**Figure 1**). Thus, the enhanced yield extraction of *P. ramosior* is related to the greater extent of cell rupture of the plant material. This is probably due to the ultrasound extraction that causes the migration of compounds from the plant material, providing an enriched extract compared to the other extracts in study ⁽²⁰⁾.

Regarding *in vitro* AChE inhibition, *P. cylindraceus* acetonetic extract showed the highest inhibition (**Figure 2**), and may have the highest content in rosmarinic acid, since a correlation between rosmarinic acid content and AChE inhibition capacity has been reported previously for four other *Plectranthus* species (*P. ecklonii*, *P. fruticosus*, *P. lanuginosus* and *P. verticillatus*) ⁽²⁰⁾. The AChE inhibition of these *Plectranthus* spp. under study was relatively low comparing to some of the synthetic medicines used, e.g. tacrine, donepezil and rivastigmine that have been reported to cause gastrointestinal disturbances and problems associated with bioavailability. Therefore, the search for new AChE inhibitors with higher efficacy, particularly from natural products, should be an important issue for search.

In vitro tests for screening antimicrobial activity were performed using Gram-positive bacteria (*S. aureus* and *E. faecalis*), Gram-negative bacteria (*P. aeruginosa* and *E. coli*) and yeasts (*C. albicans* and *S. cerevisiae*). The antimicrobial activity assay was carried out by the preliminary well diffusion method. Only *P. ramosior* acetonetic extract showed an inhibition growth against *S. aureus* and *C. albicans*, with no significant inhibition against Gram-negative bacteria. This results were in agreement with previous results for other *Plectranthus* spp. which also did not show antimicrobial activity against Gram negative bacteria ⁽¹⁴⁾.

There has been a growing interest to find natural antioxidants, including volatile chemicals, in plants due to their inhibiting oxidative damage ⁽³⁾. The acetonetic extracts under study showed low antioxidant activity. In previous studies on *Plectranthus* spp. extracts, the high content in rosmarinic acid was associated to high antioxidant activity and high AChE inhibition, on aque-

Discussão

No presente estudo, foi avaliada a inibição da acetilcolinesterase, as atividades antioxidantes e antimicrobianas e a toxicidade no modelo *Artemia salina* de sete espécies de *Plectranthus* (*P. swynner-tonii*, *P. welwischii*, *P. woodii*, *P. cylindraceus*, *P. spicatus*, *P. ramosior* e *P. petiolaris*). Os extratos acetônicos das sete espécies de *Plectranthus* foram preparados utilizando um método de extração assistido por ultrassons. Os rendimentos de extração foram determinados para todos os extratos preparados, e o extrato acetônico de *P. ramosior* revelou maiores rendimentos (**Figura 1**). Assim, o rendimento de extração de *P. ramosior* está relacionado com a maior extensão da ruptura celular do material vegetal. Isto é provavelmente devido à extração de ultrassons que causa a migração de compostos a partir do material vegetal, proporcionando um extrato enriquecido em comparação com os outros extratos em estudo ⁽²⁰⁾.

Em relação à inibição da AChE *in vitro*, o extrato acetônico de *P. cylindraceus* mostrou a maior inibição (**Figura 2**) e pode estar relacionado com o maior teor de ácido rosmarínico, uma vez que foi relatada uma correlação entre o conteúdo de ácido rosmarínico e a capacidade de inibição da AChE em quatro outras espécies de *Plectranthus* (*P. ecklonii*, *P. fruticosus*, *P. lanuginosus* e *P. verticillatus*) ⁽²⁰⁾. A inibição da AChE destas espécies de *Plectranthus* em estudo foi relativamente baixa em comparação com alguns dos medicamentos sintéticos utilizados, como a tacrina, donepezilo e rivastigmina, que foram relatados como causadores de distúrbios gastrointestinais e problemas associados à sua biodisponibilidade. Portanto, a busca por novos inibidores da AChE, particularmente a partir de produtos naturais, com maior eficácia deve ser um assunto importante a pesquisar.

Realizaram-se testes *in vitro* para rastreamento da atividade antimicrobiana utilizando bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *E. faecalis*), bactérias Gram-negativas (*P. aeruginosa* e *E. coli*) e leveduras (*C. albicans* e *S. cerevisiae*). Na atividade antimicrobiana realizada pelo método preliminar de difusão em poços, apenas o extrato *P. ramosior* mostrou uma inibição do crescimento contra *S. aureus* e *C. albicans*, e não mostrou uma inibição significativa contra bactérias Gram-negativas. Estes resultados estão de acordo com resultados anteriores para outras plantas do gênero *Plectranthus* que também não mostraram atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas ⁽¹²⁾.

Tem havido um interesse crescente para encontrar antioxidantes naturais, incluindo produtos químicos voláteis, nas plantas devido à inibição do dano oxidativo

ous extracts ⁽²⁰⁾. Since the acetonic extracts in study showed moderate AChE inhibition and also moderate antioxidant activity, the rosmarinic acid content should be low, as well as other antioxidant extract constituents. Although these results showed that *P. ramosior* was the most antioxidant, the activity was only moderate in comparison with the controls, and, additionally its AChE % inhibition was low. Hence this extract is not a potential starting point for the search of drugs that inhibit oxidative damage and may consequently prevent inflammatory conditions, ageing and neurodegenerative diseases (such as Alzheimer's disease) ⁽¹⁸⁾.

In this study, the brine shrimp lethality assay (*Artemia salina*) was preliminary used to search for the toxicity of all extracts prepared. Only three extracts were considered toxic to *A. salina* (lethality > 40%), and for those the LC₅₀ was evaluated. *P. swynnertonii* extract was the most toxic with LC₅₀ value of 0.036 mg/L, followed by *P. cylindraceus* (LC₅₀ 0.50 mg/L) and *P. ramosior* (LC₅₀ value 0.88 mg/L). *P. cylindraceus* extract showed the highest AChE % inhibition and was also toxic to the *Artemia* model. Hence, this extract is an interesting starting point for future phytochemical studies to identify which compounds are responsible for the biological activities shown.

P. ramosior acetonic extract seemed to be the most promising extract regarding its activity: it had effect on growth inhibition against bacteria and yeast, had antioxidant activity and revealed high toxicity to *A. salina* model. However, the antimicrobial activity might be due to its toxicity and this should be further investigated. Other bioactivity studies should be carried out in order to unravel other potential bioactivities and its bioactive compounds.

Consequently, this bioactivity screening of *Plectranthus* extracts is important as a preliminary study to select which plants should be investigated for further phytochemical studies. Moreover, future studies on *P. ramosior* and other active extracts (such as *P. cylindraceus*, *P. swynnertonii* and *P. petiolaris*) could be done to determine which are the bioactive compounds and their structural elucidation (by spectroscopic methods), and confirm the bioactivity of these compounds that are responsible for the biological activity revealed in this study.

Conclusion

In the present study, seven species of *Plectranthus* were analysed to evaluate their acetylcholinesterase inhibition, antimicrobial and antioxidant activities and toxicity. None of the extracts showed high acetylcholinester-

⁽³⁾. Os extratos acetónicos estudados mostraram baixa atividade antioxidante. Em estudos anteriores sobre extratos de *Plectranthus*, o alto teor de ácido rosmarínico foi associado a alta atividade antioxidante e alta inibição da AChE, em extratos aquosos ⁽²⁰⁾. Uma vez que os extratos de acetona no estudo mostraram uma inibição moderada da AChE bem como a atividade antioxidante, o teor de ácido rosmarínico deve ser baixo. Embora estes resultados tenham mostrado que *P. ramosior* foi o mais antioxidante, a atividade foi apenas moderada em comparação com os controlos e, adicionalmente, a sua inibição de AChE foi baixa. Por conseguinte, este extrato não é um potencial ponto de partida para a pesquisa de fármacos que inibem o dano oxidativo, podendo consequentemente prevenir condições inflamatórias, envelhecimento e doenças neurodegenerativas (como a doença de Alzheimer) ⁽¹⁸⁾.

O ensaio de letalidade no modelo da *Artemia salina*, foi utilizado preliminarmente para pesquisar a toxicidade de todos os extratos preparados neste estudo. Apenas três extratos foram considerados tóxicos para *A. salina* (letalidade > 40%), e para os que foram avaliados a LC₅₀. O extrato de *P. swynnertonii* foi o mais tóxico com LC₅₀ de 0,036 mg/L, seguido do *P. cylindraceus* (LC₅₀ - 0,50 mg/L) e *P. ramosior* (LC₅₀ - 0,88 mg/L). O extrato de *P. cylindraceus* apresentou a maior inibição de AChE e também foi tóxico para o modelo de *Artemia*. Assim, este extrato é um ponto de partida interessante para futuros estudos fitoquímicos, de modo a poder identificar quais os compostos que são responsáveis pelas atividades biológicas mostradas.

O extrato acetónico de *P. ramosior* parece ser o extrato mais promissor em relação às atividades biológicas estudadas: obteve efeito sobre a inibição do crescimento contra bactérias e leveduras em estudo, obteve atividade antioxidante e revelou alta toxicidade ao modelo de *A. salina*. No entanto, a actividade antimicrobiana pode ser devida à sua toxicidade e isto deve ser investigado mais a fundo. Outros estudos de bioactividade devem ser realizados para desvendar outras potenciais bioactividades e quais os compostos bioactivos responsáveis pelas actividades reveladas.

Consequentemente, este rastreio de bioactividade de extractos de *Plectranthus* é importante como um estudo preliminar, para seleccionar quais as plantas que devem ser investigadas para estudos fitoquímicos adicionais. Além disso, estudos futuros sobre *P. ramosior* e outros extratos ativos (como *P. cylindraceus*, *P. swynnertonii* e *P. petiolaris*) podem ser realizados para revelar quais são os compostos bioativos e sua elucidação estrutural (por métodos espectroscópicos) e confirmar a bioactividade desses compostos que são responsáveis pela atividade biológica revelada.

ase inhibition or antioxidant activities. Only *P. ramosior* acetonic extract exhibited antimicrobial activity, showing positive results against the Gram-positive bacteria and yeasts tested. Three extracts were toxic against the brine shrimp, with *P. swynnertonii* being the most toxic. *P. ramosior* acetonic extract exhibited antimicrobial activity. This preliminary study allows the selection of which plants should be chosen for future studies. Further studies should be undertaken to identify the bioactive compounds responsible for these bioactivities of the active extracts. (*P. ramosior*, *P. swynnertonii*, *P. cylindraceus* and *P. petiolaris*).

Conflict of interest

The authors declares that there are no financial or personal relationships that could be viewed as a potential conflict of interest.

Conclusão

No presente estudo, sete espécies de *Plectranthus* foram analisadas para avaliar a inibição da acetilcolinesterase, atividades antimicrobiana e antioxidante, e toxicidade. Nenhum dos extratos mostrou elevada inibição de acetilcolinesterase ou atividade antioxidante. Somente o extrato acetônico de *P. ramosior* mostrou resultados positivos contra bactérias Gram-positivas e leveduras testadas. Três extratos foram tóxicos contra o modelo de *A. salina*, sendo *P. swynnertonii* o mais tóxico. O extrato acetônico de *P. ramosior* exibiu atividade antimicrobiana. Este estudo preliminar permite selecionar quais as plantas que devem ser escolhidas em estudos futuros. Outros estudos devem ser realizados para identificar os compostos bioativos responsáveis por essas bioatividades dos extratos ativos (*P. ramosior*, *P. swynnertonii*, *P. cylindraceus* e *P. petiolaris*).

Conflito de Interesses

Os autores declaram não existir qualquer relação de natureza financeira ou pessoal que possa ser entendida ou representar um potencial conflito de interesses.

References/Referências

1. Lukhoba CW, Simmonds MSJ, Paton AJ. Plectranthus: A review of ethnobotanical uses. *J Ethnopharmacol.* 2006;103(1):1–24.
2. Rice LJ, Brits GJ, Potgieter CJ, Van Staden J. Plectranthus: A plant for the future? *South African J Bot.* 2011;77(4):947–59.
3. Rijo P, Batista M, Matos M, Rocha E, Jesus S, Simões M. Screening of antioxidant and antimicrobial activities on Plectranthus spp. extracts. *Biomed Biopharm Res.* 2012;9(2):225–35.
4. Rijo P, Matias D, Fernandes AS, Simões MF, Nicolai M, Reis CP. Antimicrobial plant extracts encapsulated into polymeric beads for potential application on the skin. *Polymers (Basel).* 2014;6(2):479–90.
5. Davinelli S, Sapere N, Zella D, Bracale R, Intriери M, Scapagnini G. Pleiotropic Protective Effects of Phytochemicals in Alzheimer’s Disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2012;2012:1–11.
6. Tabet N. Acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer’s disease: anti-inflammatories in acetylcholine clothing! *Age Ageing.* 2006;35(4):336–8.
7. Colović MB, Krstić DZ, Lazarević-Pašti TD, Bondžić AM, Vasić VM. Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Curr Neuropharmacol.* 2013;11(3):315–35.
8. Sung SH, Kang SY, Lee KY, Park MJ, Kim JH, Park JH, et al. (+)-Alpha-viniferin, a stilbene trimer from Caragana chamlague, inhibits acetylcholinesterase. *Biol Pharm Bull.* 2002;25(1):125–7.
9. Duracková Z. Some current insights into oxidative stress. *Physiol Res.* 2010;59(4):459–69.
10. Bonomini F, Rodella LF, Rezzani R. Metabolic syndrome, aging and involvement of oxidative stress. *Aging Dis.* 2015;6(2):109–20.
11. Guimarães DO, Momesso L da S, Pupo MT. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Quim Nova.* 2010;33(3):667–79.
12. Kubínová R, Pořízková R, Navrátilová A, Farsa O, Hanáková Z, Bačinská A, et al. Antimicrobial and enzyme inhibitory activities of the constituents of Plectranthus madagascariensis (Pers.) Benth. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2014;29(5):749–52.
13. Albar H. Phytochemical composition and antimicrobial activities of the essential oil from Plectranthus tenuiflorus growing in Saudi Arabia. *KauEduSa.* 2002;1–9.
14. Rijo P, Batista M, Matos M, Rocha H, Jesus S, Simões MF. Screening of antioxidant and antimicrobial activities on Plectranthus spp. extracts. *Biomed Biopharm Res.* 2012;9(2):225–35.
15. Karchesy YM, Kelsey RG, Constantine G, Karchesy JJ. Biological screening of selected Pacific Northwest forest plants using the brine shrimp (*Artemia salina*) toxicity bioassay. *Springerplus.* 2016;5:510–8.
16. Chen X, Guo C, Kong J. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Neural Regen Res.* 2012;7(5):376–85.
17. Hamidi MR, Jovanova B, Panovska TK. Toxicological evaluation of the plant products using Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) model. *Maced Pharm Bull.* 2014;60(1):9–18.
18. Alanís-Garza BA, González-González GM, Salazar-Aranda R, Waksman de Torres N, Rivas-Galindo VM. Screening of antifungal activity of plants from the northeast of Mexico. *J Ethnopharmacol.* 2007;114(3):468–71.
19. Meyer B, Ferrigni N, Putnam J, Jacobsen L, Nichols D, McLaughlin J. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Med.* 1982;45(5):31–4.
20. Rijo P, Falé PL, Serralheiro ML, Simões MF, Gomes A, Reis C. Optimization of medicinal plant extraction methods and their encapsulation through extrusion technology. *Measurement.* 2014;58:249–55.