



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

ESTUDO DA BIOATIVIDADE DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE TOMILHOS DE PORTUGAL

Thymus albicans Hoffm. & Link e *Thymus lotocephalus* G. Lopèz & R. Morales

Mariana Roxo Martins Caril Correia

2014



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

ESTUDO DA BIOATIVIDADE DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE TOMILHOS DE PORTUGAL

Thymus albicans Hoffm. & Link e *Thymus lotocephalus* G. Lopèz & R. Morales

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Lígia Maria Ribeiro Pires Salgueiro Silva Couto (Universidade de Coimbra) e do Professor Doutor Jorge Manuel Leal Pataca Canhoto (Universidade de Coimbra)

Mariana Roxo Martins Caril Correia

2014

Agradecimentos

Aos meus orientadores, Professora Doutora Lúgia Salgueiro e Professor Doutor Jorge Canhoto, pela sua disponibilidade e dedicação na orientação deste trabalho, bem como pelo encorajamento e competência na orientação do estudo.

Um agradecimento muito especial à Professora Doutora Maria José Gonçalves e à Doutora Mónica Zuzarte a quem devo todo o conhecimento necessário para a execução do trabalho laboratorial. Agradeço também pelo relevante contributo que ambas deram para o desenvolvimento do meu sentido crítico e de responsabilidade científica. À Melissa Alves pela sua amizade e apoio em todas as fases deste trabalho.

À Professora Doutora Maria Teresa Cruz do Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra por me ter proporcionado a oportunidade para a realização de uma parte fulcral deste projeto.

Agradeço a todos os meus colegas de laboratório pelo companheirismo académico e ajuda em fases importantes do percurso, nomeadamente dos laboratórios de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia, de Biotecnologia Vegetal e Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra.

Não podia deixar de dedicar estas últimas linhas às minhas Ana Rita Carvalho e Patrícia Fernandes subsp. *migas* por todo o carinho e amizade que me têm dedicado.

Ao Óscar, à Mariana, à Joana Marques Silva, ao Miguel Diogo, à Maria Inês e ao Fernando Cáceres pelo *amor*.

Aos meus pais pela liberdade e apoio absolutamente incondicionais.

À minha irmã pela inspiração.

ÍNDICE

RESUMO.....	V
ABSTRACT	VII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
I. INTRODUÇÃO.....	X
1. Considerações Gerais	2
1.1. As Plantas Aromáticas e Medicinais em Portugal.....	2
2. O Género <i>Thymus</i>	4
2.1. Taxonomia, Distribuição e Importância	4
2.2. Espécies em estudo	6
2.2.1. <i>Thymus albicans</i>	6
2.2.1.1. Distribuição	6
2.2.1.2. Descrição botânica.....	7
2.2.1.3. Composição química e bioatividade do óleo essencial	8
2.2.2. <i>Thymus lotocephalus</i>	9
2.2.2.1. Distribuição	9
2.2.2.3 Composição química e bioatividade do óleo essencial	11
3. Objetivos.....	12
4. Bibliografia.....	13
II. ATIVIDADE ANTIFÚNGICA	20
1. Introdução	21
1.1. Candidíases.....	23
1.2. Criptococoses	24
1.3. Aspergiloses	25
1.4. Dermatofitoses.....	26
2. Material e Métodos.....	29
2.1. Material vegetal	29
2.2. Isolamento dos óleos essenciais e análise.....	29
2.3. Compostos puros e de referência.....	29
2.4. Estirpes fúngicas testadas e seu cultivo.....	30
2.5. Atividade antifúngica	31
2.6. Mecanismo de ação	33
2.6.1. Inibição do tubo germinativo.....	33
2.6.2. Efeito do óleo essencial na função mitocondrial de células de levedura..	34
3. Resultados	35
3.1. Atividade antifúngica	35
3.1.1. <i>Thymus albicans</i>	35
3.1.2. <i>Thymus lotocephalus</i>	36
3.2. Inibição do tubo germinativo.....	40
3.2.1. <i>Thymus albicans</i>	40

3.2.2. <i>Thymus lotocephalus</i>	40
3.3. Efeito do óleo essencial na função mitocondrial de células de levedura.....	42
4. Discussão	43
5. Bibliografia.....	47
III. ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA	57
1. Introdução	58
2. Material e Métodos	61
2.1. Óleos essenciais	61
2.2. Linha celular e condições de cultura	61
2.3. Inibição da produção de óxido nítrico	62
2.4. Viabilidade celular.....	62
2.5. Mecanismo de ação	63
2.5.1. Atividade <i>scavenging</i>	63
2.5.2. Preparação dos lisados celulares e análise por <i>Western blot</i>	63
2.6. Análise estatística	65
3. Resultados	65
3.1. Inibição da produção de NO e viabilidade celular	65
3.1.1. <i>Thymus albicans</i>	65
3.1.2. <i>Thymus lotocephalus</i>	66
3.2. Mecanismo de ação	67
3.2.1. Atividade <i>scavenging</i>	67
3.2.2. Níveis de proteína iNOS e COX-2	68
4. Discussão	70
5. Bibliografia.....	72
IV. VIABILIDADE CELULAR	77
1. Introdução	78
2. Materiais e Métodos	80
2.1. Linhas celulares	80
2.2. Viabilidade celular.....	81
2.3. Análise estatística	81
3. Resultados	82
3.1. Viabilidade celular.....	82
4. Discussão	84
5. Bibliografia.....	86
V. FITOTOXICIDADE	90
1. Introdução	91
2. Materiais e Métodos	92
2.1. Composto puro	92
2.2. Linha celular e condições de cultura	92
2.3. Inibição da proliferação de células vegetais	92
2.4. Análise estatística	93
3. Resultados	93
3.1. Inibição da proliferação de células vegetais	93

4. Discussão	95
5. Bibliografia.....	97
VI. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	99

RESUMO

O género *Thymus* L. compreende espécies aromáticas de grande relevo etnobotânico e industrial, essencialmente devido aos seus óleos essenciais que possuem múltiplas utilizações na medicina tradicional dos povos do Mediterrâneo e aplicações nas indústrias de perfumes, cosméticos, produtos farmacêuticos e agro-alimentares. Embora este género se encontre muito bem representado em Portugal, poucos estudos se têm direcionado para a avaliação do potencial bioativo de tomilhos endémicos, visando a validação científica das suas propriedades e determinação do seu perfil de segurança.

Neste contexto, tendo como objeto de estudo os óleos essenciais de duas espécies de tomilhos, *Thymus albicans* Hoffm. & Link, um endemismo ibérico, e *Thymus lotocephalus* G. Lopèz & R. Morales, um endemismo lusitânico, determinaram-se, com recurso a modelos *in vitro*, a atividade antifúngica, anti-inflamatória, e respetivos mecanismos de ação, bem como a citotoxicidade em diferentes linhas celulares de mamíferos, visando a sua aplicação eficaz e segura como agentes terapêuticos alternativos e/ou complementares.

O potencial antifúngico dos óleos essenciais e dos seus compostos maioritários isolados (1,8-cineol, α -terpineol, borneol e óxido de cariofileno) foi avaliado através da determinação da concentração mínima inibitória (MIC) e da concentração mínima letal (MLC). Adicionalmente, o efeito dos óleos essenciais na inibição do tubo germinativo e na atividade de enzimas mitocondriais (viabilidade celular) foi também determinado para *Candida albicans* ATCC 10231. Os óleos essenciais em estudo demonstraram ter, de um modo geral, melhor atividade do que os seus compostos maioritários isolados, com eficácia contra estirpes de *Candida*, *Cryptococcus neoformans*, dermatófitos e *Aspergillus*, tendo sido mais ativos contra as estirpes de dermatófitos, com valores de MIC e MLC entre 0,16 e 1,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Demonstraram, também, capacidade de inibir a formação do tubo germinativo a concentrações sub-inibitórias e de comprometer a função mitocondrial de forma dose-dependente.

A atividade anti-inflamatória dos óleos essenciais foi determinada usando o modelo *in vitro* de macrófagos de ratinho (Raw 264,7) estimulados por LPS, pela avaliação da sua capacidade de inibir a produção de óxido nítrico (NO), um mediador chave do processo inflamatório. De forma a elucidar o mecanismo de ação, foi também avaliado o potencial “scavenger” e o efeito do óleo mais ativo na expressão de enzimas chave, nomeadamente a forma induzível da sintase do NO (iNOS) e da ciclo-oxigenase

(COX-2). Os resultados obtidos revelam atividade anti-inflamatória do óleo essencial de *T. albicans* pela inibição da produção de NO e da expressão de iNOS (0,64 $\mu\text{L mL}^{-1}$).

Tendo em consideração o potencial bioativo do óleo essencial de *T. albicans* para futuras aplicações terapêuticas em humanos e animais, foi determinado o seu perfil de segurança através de ensaios de citotoxicidade (viabilidade celular) em macrófagos (Raw, 264,7), queratinócitos (HaCat) e hepatócitos (HepG2). O óleo essencial não revelou toxicidade para as linhas celulares estudadas a concentrações em que: é fungicida para dermatófitos (0,16 $\mu\text{L mL}^{-1}$); é capaz de inibir a formação do tubo germinativo (0,16 e 0,32 $\mu\text{L mL}^{-1}$), um importante fator de virulência cuja inibição é relevante para o tratamento de candidíases invasivas, e para as quais apresenta atividade anti-inflamatória (0,32 e 0,64 $\mu\text{L mL}^{-1}$).

Assim, o rendimento do óleo essencial de *T. albicans*, o seu potencial antifúngico e anti-inflamatório, bem como o amplo perfil de segurança demonstrados, garantem o interesse industrial para futura comercialização. Nesse sentido, ensaios futuros visando o desenvolvimento de um cosmeceutico ou nutracêutico para complemento terapêutico em infecções fúngicas e doenças de cariz inflamatório, são justificados.

Adicionalmente, estabeleceu-se e otimizou-se um protocolo de avaliação da fitotoxicidade de um composto maioritário nestes óleos, o 1,8-cineol, numa linha celular de medula de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), BY-2, que permitirá, entre outras aplicações possíveis, avaliar o potencial herbicida dos óleos, visando o desenvolvimento futuro de um bioherbicida de origem terpénica, de forma a minimizar a contaminação ambiental e o surgimento de ervas daninhas resistentes, resultante do uso de herbicidas sintéticos.

Palavras-chave: *Thymus albicans*, *Thymus lotocephalus*, atividade antifúngica, atividade anti-inflamatória, viabilidade celular, fitotoxicidade.

ABSTRACT

The genus *Thymus* L. comprises aromatic plants of great ethnobotanical and industrial relevance, mainly due to its essential oils highly valued in traditional medicine, primarily in the Mediterranean region and in several industries including perfumery, cosmetic, pharmaceutical, agricultural, food and beverages. Although thyme species are very common in Portugal, studies on the bioactive potential and safety profile of endemic plants remain sparse.

Therefore, the present study aims the valorization of *Thymus albicans* Hoffm. & Link, an Iberian endemism, and *Thymus lotocephalus* G. López & R. Morales, a portuguese endemism, by validating the antifungal and anti-inflammatory activities, and related mechanisms of action of their essential oils and pointing out their safety profile in different mammalian cell lines, for future application as effective and safe alternative and/or complementary therapeutic agents.

The antifungal potential of the oils and their major compounds (1,8-cineole, α -terpineol, borneol and caryophyllene oxide) was assessed by evaluating the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimal lethal concentration (MLC). Additionally, the effect of essential oils in both the germ tube inhibition and mitochondrial enzymes activity (cell viability) was also determined for *Candida albicans* ATCC 10231. In general, the essential oils were more effective than the isolated major compounds, against strains of *Candida*, *Cryptococcus neoformans*, dermatophytes and *Aspergillus*, being more active against dermatophytes, with MIC and MLC values varying between 0.16 and 1.25 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Moreover, their ability to inhibit the formation of germ tubes at sub-inhibitory concentrations and to impair mitochondrial function in a dose-dependent manner were also pointed out.

The anti-inflammatory activity of essential oils was assessed using an *in vitro* model of murine macrophages (Raw 264.7) stimulated with LPS, through their ability to inhibit the production of nitric oxide (NO), a key mediator of inflammation. In order to elucidate mechanisms of actions underlying this effect, the oil's scavenging activity as well as the effect of the most active oil on the expression of key enzymes, including inducible NO synthase (iNOS) and cyclooxygenase (COX-2) were also evaluated. The results confirm the anti-inflammatory potential of *T. albicans* essential oil through inhibition of NO production and a selective inhibition of iNOS expression (0.64 $\mu\text{L mL}^{-1}$).

Taking into account the bioactive potential of *T. albicans* essential oil for future therapeutic applications in humans and animals, its safety profile was disclosed. Cytotoxicity assays (cell viability) were carried out in macrophages (Raw 264.7), keratinocytes (HaCat) and hepatocytes (HepG2). The essential oil was devoid of toxicity at concentrations for which it showed: fungicidal activity against dermatophytes ($0.16 \mu\text{L mL}^{-1}$); inhibited germ tube formation (0.16 -and $0.32 \mu\text{L mL}^{-1}$), an important virulence factor whose inhibition is relevant for the treatment of invasive candidiasis, and for which it revealed anti-inflammatory activity ($0.32 \mu\text{L mL}^{-1}$ and 0.64 mL^{-1}).

Thus, the yield of *T. albicans* essential oil, its antifungal and anti-inflammatory potential, as well as its broad safety profile, supports its industrial relevance and future commercialization. Thereby, future assays should be considered for development of a cosmeceutical or nutraceutical as therapeutic complements in fungal infections and inflammatory-related diseases.

Furthermore, a protocol for assessing the phytotoxicity of the essential oil's major compound, 1,8-cineole, was established and optimized, using a tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) cell line BY-2. Among other possible applications, this protocol allows the evaluation of essential oils herbicidal potential, aiming the further development of a terpene-based bioherbicide, in order to minimize the environmental contamination and the emergence of resistant weeds, related to the extensive use of synthetic herbicides.

Keywords: *Thymus albicans*, *T. lotocephalus*, antifungal activity, anti-inflammatory activity, cell viability, phytotoxicity.

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC - American Type Culture Collection
BCA - Ácido Bicinconínico
CECT- Colección Española de Cultivos Tipo
CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute
COX-2 - Ciclooxygenase induzida
DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO - Dimetil Sulfóxido
ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ESCOF - European Scientific Cooperative on Phytotherapy
FAO - Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura
iNOS - Óxido Nítrico-sintase induzida
LPS - Lipopolissacarídeo
MIC - Concentração Mínima Inibitória
MLC - Concentração Mínima Letal
MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards
NF-KB - Factor Nuclear – KB
NO - Óxido Nítrico
NYP- N-acetilglucosamine, Yeast Nitrogen Base, Proline
PDA - Potato Dextrose Agar
PGE2 -Prostagladina E2
RPMI - Roswell Park Memorial Institute
ROS – Espécies Reactivas de Oxigénio
SDA -Saboraud Dextrose Agar
SEM- Erro padrão da média
TBS - Tampão Tris salino

I. INTRODUÇÃO

1. Considerações Gerais

As plantas são, sem dúvida, o recurso renovável mais abundante e de melhor relação custo-benefício, adaptado para a produção de compostos bioativos (Raskin *et al.*, 2002). Em consequência dessa propriedade, no decurso de milhares de anos, os povos indígenas foram desenvolvendo, por *tentativa e erro*, um conhecimento profundo sobre as propriedades terapêuticas da sua flora local, passado oralmente de geração em geração e registado em importantes documentos escritos que hoje se encontram globalmente difundidos (Proença da Cunha & Roque, 2010).

Não obstante a influência de outras fontes naturais, as plantas medicinais formaram a base de sofisticados Sistemas de Medicina Tradicional, cujas práticas e produtos constituem, segundo a Organização Mundial de Saúde, o principal recurso terapêutico de 70 a 95% dos cidadãos, especialmente nos países Asiáticos, Africanos, Latino-Americanos e Médio-Orientais (WHO, 2011). Nos países como o Canadá, França, Alemanha e Itália, onde nos últimos 100 anos prosperaram os medicamentos com origem na química de síntese, verifica-se uma crescente tendência de recurso a produtos de uso tradicional com finalidades terapêuticas, tendo sido reportado, pela mesma organização, que 70 a 90 % da população recorre a medicinas tradicionais sob a designação de medicinas complementares/alternativas (Wachtel-Galor & Benzie, 2011; WHO, 2011).

Na história mais recente, o uso das plantas na terapêutica envolveu o isolamento de compostos ativos, iniciado com o isolamento da morfina a partir da papoila do ópio no início do século dezanove, seguindo-se outras drogas como a cocaína, codeína e quinina (Balunas & Kinghorn, 2005). Além do uso direto dos seus constituintes como agentes terapêuticos, esses compostos podem ainda servir de base para a hemissíntese de medicamentos, e para o desenvolvimento de novos modelos, servindo como protótipos naturais (Cragg *et al.*, 2012). Nos últimos 30 anos, mais de 25% dos novos fármacos aprovados são baseadas em moléculas de origem vegetal e cerca de 50% dos produtos químicos mais vendidos derivam do metabolismo secundário das plantas (Gómez-Galera *et al.*, 2007).

1.1. As Plantas Aromáticas e Medicinais em Portugal

No que respeita a biodiversidade vegetal, a Bacia do Mediterrâneo é o terceiro Hotspot de Biodiversidade mais importante da Terra (Mittermeier *et al.*, 2004).

Constituindo apenas 1,6% da superfície terrestre, comporta cerca de 10% da diversidade de plantas vasculares, apresentando um elevado número de endemismos e epicentros de diversidade das plantas (Medail & Quèzel, 1999).

Apesar de não atingir a popularidade de outros Hotspots de Biodiversidade, como são os das zonas tropicais, os ecossistemas mediterrânicos estão entre os mais ameaçados do globo (The Nature Conservancy, 2011). As profundas alterações do seu ambiente físico e biológico, causadas pela grande pressão exercida pelas atividades humanas, o deslocamento da população rural para as zonas urbanas, bem como a crescente facilidade e frequência de circulação de pessoas entre países, tem não só levado à perda de biodiversidade e conseqüente património genético, como também à perda irreversível da cultura tradicional dos povos do Mediterrâneo (González - Tejero *et al.*, 2008), na qual se inserem as ancestrais relações estabelecidas com as plantas e seus usos medicinais que têm sido passadas de geração em geração, estando este *saber*, na sua quase absoluta maioria não documentado.

O território português, pese embora a sua reduzida dimensão, apresenta uma componente florística muito diversificada como resultado da convergência de diferentes áreas fitogeográficas (Costa *et al.*, 1998). Das 3800 espécies que compõe o seu coberto vegetal, 500 são aromáticas e/ou medicinais (Figueiredo *et al.*, 2007). Dada a predominância do clima mediterrânico e a sua situação geográfica, Portugal possui as condições edafo-climáticas ideais para o desenvolvimento de plantas aromáticas (Salgueiro, 1994).

A crescente consciência da importância da documentação das práticas de utilização tradicional das plantas aromáticas e medicinais como fonte de novos agentes e alternativas terapêuticas levou a que, essencialmente a partir do ano 2000, se intensificassem em Portugal estudos etnobotânicos e etnofarmacológicos. A maioria dos quais se enquadrou no projeto “Plantas Aromáticas e Medicinais da Rede Nacional de Áreas Protegidas”, desenvolvido pelo Instituto da Conservação da Natureza, entre o ano 1999 e 2004 (Santos, 2000; Fernandes, 2001; Camejo-Rodriges *et al.*, 2003).

Nas suas diversas vertentes, o valor das plantas aromáticas está, essencialmente, relacionado com a qualidade e quantidade dos seus óleos essenciais. Neste contexto, diversos investigadores se têm dedicado ao estudo das propriedades bioativas dos óleos essenciais, com especial incidência sobre a família *Lamiaceae*, por incluir géneros de grande relevância etnobotânica e industrial, entre os quais se destaca o género *Thymus*,

sobre o qual incidirá este estudo (Santos-Gomes *et al.*, 2001; Gonçalves *et al.*, 2007; Barros *et al.*, 2010; Zuzarte, 2013).

2. O Género *Thymus*

2.1. Taxonomia, Distribuição e Importância

Devido ao elevado número de espécies que compreende, o género *Thymus* L. constitui um dos oito géneros mais importantes da família *Lamiaceae*, também designadas Labiadas, com cerca de 240 géneros e 7180 espécies (Morales, 2002; Harley *et al.*, 2004).

As cerca de 220 espécies que compõem o género, encontram-se distribuídas por toda a Eurásia (exceptuando as regiões tropicais do Sul e Sudeste), região Macaronésica, Norte de África, montanhas de Abissínia e do Iémen (Fig. 1) (Morales, 2010).

O género *Thymus* encontra o seu centro na Região Mediterrânica, na qual ocorrem espécies incluídas em sete das oito secções botânicas definidas por Morales (2002). Em Portugal vegetam onze espécies, num total de catorze *taxa*, que se distribuem por cinco secções: sect. *Micantes* Velen., sect. *Mastichina* (Mill.) Benth., sect. *Pseudothymbra* Benth., sect. *Thymus* - subsect. *Thymus* e subsect. *Thymastra* R. Morales, sect. *Serpyllum* (Mill.) Benth - subsect. *Alternantes* Klover e subsect. *Pseudomarginati* (H. Braun & Borbás) Jalas.

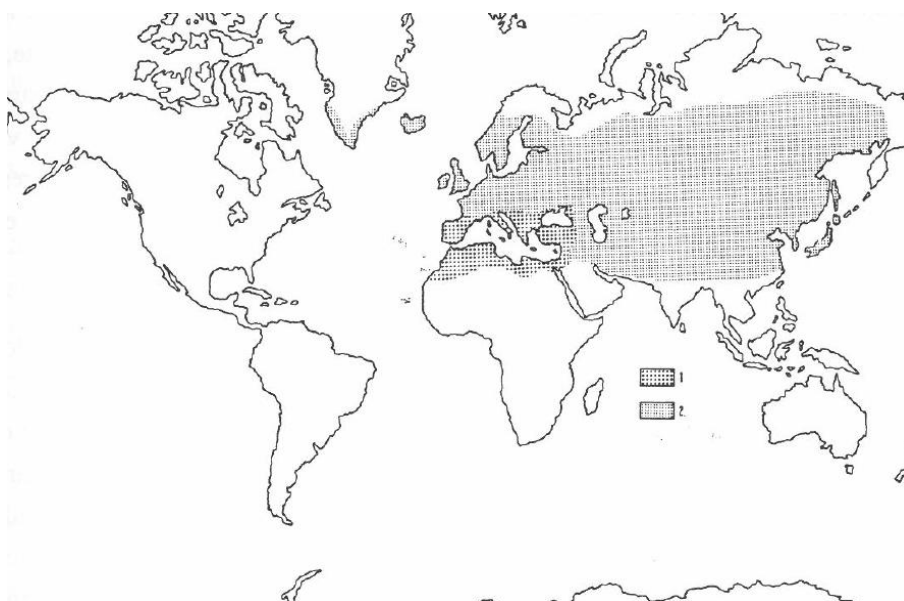


Figura 1. Distribuição do género *Thymus* (1. Género *Thymus* excluindo a secção *Serpyllum*; 2. secção *Serpyllum*) (Salgueiro, 1994).

Uma vez que se tratam de plantas amplamente conhecidas e popularmente utilizadas em toda a sua área de distribuição, existe uma grande variedade de nomes vernáculos que diferem intra e inter-regionalmente. Importa então ressaltar que, em Portugal, a designação vulgar de tomilho é aplicada indiscriminadamente a todas as espécies do género *Thymus*, incluindo os híbridos, variedades e ecótipos, bem como à espécie *Thymbra capitata* (L.) Cav., por esta já ter sido incluída neste género (Salgueiro, 1994).

O uso dos tomilhos como condimento é muito comum na gastronomia tradicional de países da região Mediterrânica, sendo muito utilizado pelas suas qualidades aromáticas e de preservação dos alimentos (Figueiredo *et al.*, 2008). A indústria agro-alimentar, obedecendo à atual tendência de "consumo verde" e ao alerta para a redução do consumo de sal por parte da Organização Mundial de Saúde (com vista à redução da incidência de doenças cardiovasculares), tem também explorado estas propriedades usando, entre outros extratos, os óleos essenciais de tomilho. Estes óleos voláteis podem ser uma fonte natural de componentes antimicrobianos e antioxidantes, permitindo evitar a deterioração de alimentos com alto grau de perecibilidade, aumentando a segurança do seu consumo e o seu prazo de validade sem recurso a aditivos sintéticos (Burt, 2004; Gómez-Estaca *et al.*, 2010; Aubourg, 2011).

No que respeita às suas potencialidades medicinais, as infusões de várias espécies de tomilho são empregues tradicionalmente no tratamento de afeções gastro-intestinais devido às suas propriedades anti-espasmódicas; tanto as plantas como os seus óleos essenciais são usados no tratamento de afeções da garganta, tosse irritativa e bronquite; sob a forma de elixir bucal são usados nas inflamações das gengivas e topicamente na limpeza da pele em situações de acne (Figueiredo *et al.*, 2008).

Canigual & Vanaclocha (2000), no seu artigo de revisão sobre os usos terapêuticos do fármaco de tomilho, *Thymi herba*, obtido a partir das partes aéreas floridas de *Thymus vulgaris* L. e/ou *Thymus zygis* Loefl. ex. L., descrevem algumas ações farmacológicas importantes, como a atividade anti-espasmódica e expectorante, anti-séptica e anti-inflamatória. Referem ainda a atividade antioxidante, a estimulação da leucopoiese, a regulação hormonal e as suas propriedades digestivas. Algumas das suas propriedades farmacológicas ficam a dever-se aos seus óleos essenciais ricos em timol e carvacrol (terpenos fenólicos) e aos flavonóides (polifenóis).

Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), os tomilhos constituem uma das mais importantes culturas de plantas aromáticas de ambientes não tropicais (Douglas *et al*, 2005).

Dadas as suas múltiplas potencialidades e utilizações, os tomilhos têm uma importância económica de relevo, como se comprova pela sua referenciação num grande número de monografias que visam o estabelecimento de regras de qualidade, segurança e eficácia, como as Farmacopeias de diversos países, ESCOP (European Scientific Cooperative on Phytotherapy), Comissão E Alemã e Organização Mundial de Saúde.

No presente trabalho, selecionaram-se as espécies de tomilhos espontâneos *Thymus albicans* Hoffm. & Link da sect. *Mastichina*, e *Thymus lotocephalus* G. Lopèz & R. Morales da sect. *Pseudothymbra*, subsect. *Pseudothymbra*, para a avaliação da bioatividade dos seus óleos essenciais.

2.2. Espécies em estudo

2.2.1. *Thymus albicans*

2.2.1.1. Distribuição

Thymus albicans Hoffm. & Link, vulgarmente conhecido como tomilho alvadio, é um endemismo da zona costeira do sudoeste da Península Ibérica, e em Portugal encontra-se apenas numa área restrita do Algarve, sendo pouco frequente (Salgueiro, 1994).

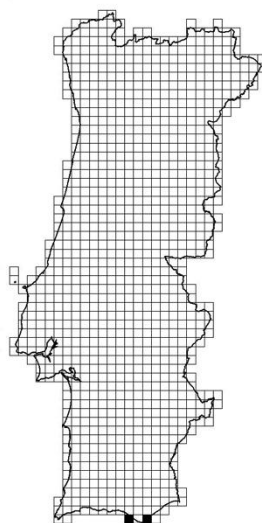


Figura 2. Distribuição em Portugal de *Thymus albicans* Hoffm. & Link (Carapeto & Pereira, 2014). Quadrícula UTM *standard* no datum WGS84 com 10 km de lado.

2.2.1.2. Descrição botânica

Trata-se de um subarbusto erecto até 80 cm, semelhante a *Thymus mastichina*. Folhas pecioladas, 4-8 x 1-3 mm, elípticas, planas, por vezes, curtamente denticuladas na margem, não ciliadas na base; as fasciculadas, menores, cinéreo-tomentosas; as dos caules anuais maiores, tomentosas e verdes. Capítulos globosos, c. 9 mm de diâmetro. Brácteas 3-5 x 2-3,5 mm, largamente ovadas, não semelhantes às folhas, geralmente ciliadas. Cálice 2,5-3,5 (4) mm longo; dentes inferiores curtos, até 1,5 mm longos, mais curtos que o tubo; dentes superiores mais pequenos e mais largos, todos curtamente ciliados. Corola esbranquiçada, pouco maior que o cálice (Salgueiro, 1994).

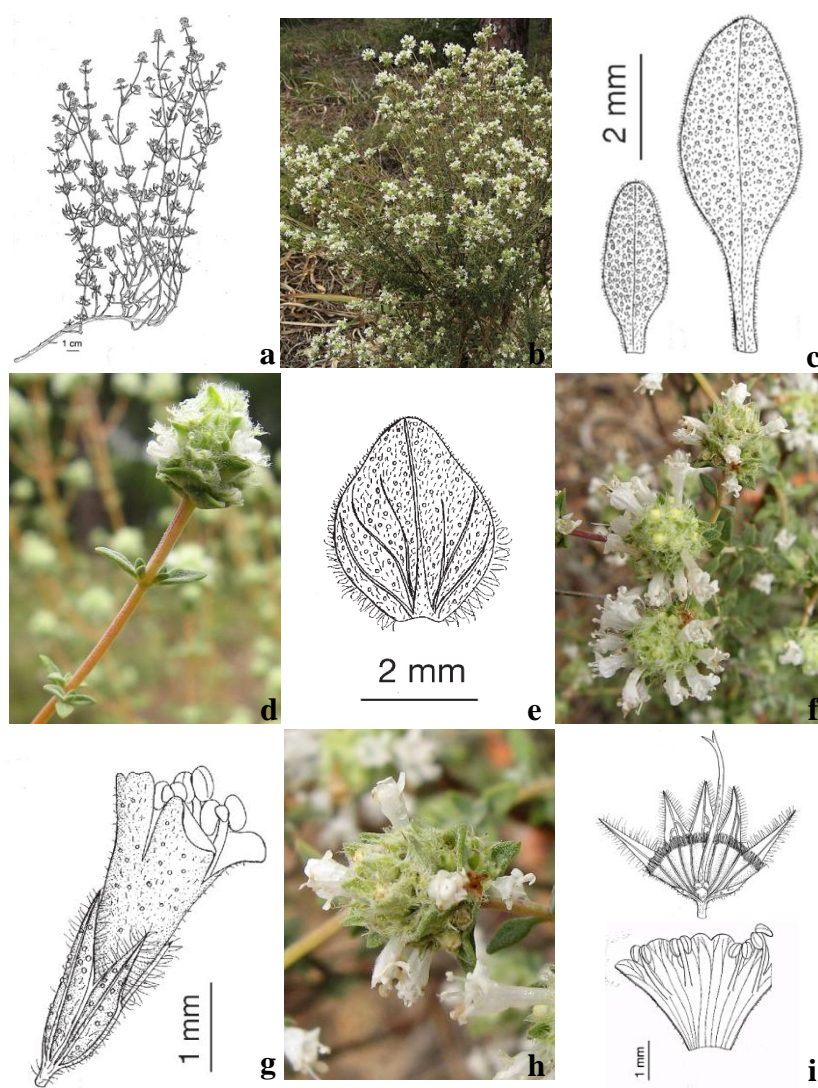


Figura 3. *Thymus albicans* Hoffm. & Link, **a)** desenho esquemático do hábito; **b)** planta no habitat natural; **c)** desenho esquemático da folha jovem de um fascículo axilar e da folha caulinar; **d)** capítulo e folhas em pormenor; **e)** desenho esquemático da bráctea; **f)** pormenor das

flores; **g**) desenho esquemático da flor em vista lateral; **h**) pormenor da corola; **j**) desenho esquemático da abertura ventral do cálice com gineceu e da corola. [Adaptado de Flora Ibérica e Flora-On (Morales, 2010; Pereira, 2014)]

2.2.1.3. Composição química e bioatividade do óleo essencial

A composição química do óleo essencial de *Thymus albicans* de Portugal foi referida pela primeira vez por Palhinha (1946), que reportou timol na sua constituição. Em 1986, Morales descreve duas amostras de *T. albicans* espanhol, uma com 1,8-cineol como principal constituinte e outra com uma elevada concentração de 1,8-cineol e linalol (Morales, 1986). No seu trabalho extensivo sobre os tomilhos portugueses e os seus óleos essenciais, Salgueiro (1994) refere como constituintes principais do óleo essencial o 1,8-cineol e o linalol, distinguindo três quimiotipos: óleo essencial rico em 1,8-cineol (42,6%); óleo essencial com elevada percentagem de linalol e 1,8-cineol (40,8 % e 25,8 %, respetivamente) e óleo essencial rico em linalol (44,5 %).

De acordo com Miguel *et al.* (2004a), no óleo essencial de *T. albicans* obtido por hidrodestilação das folhas e das flores separadamente, colhidas em três áreas distintas (Gambelas, Ancão e Quinta do Lago), da região protegida da Ria Formosa no Algarve, o 1,8-cineol foi o monoterpeno oxigenado mais representativo, sendo também o composto maioritário. O óleo obtido a partir das folhas (67,9; 62,2; 46,6 % de 1,8-cineol) apresentou maiores teores deste composto do que o óleo das flores (59,5; 56,2; 42,1 % de 1,8-cineol). Os óleos das plantas da Quinta do Lago mostraram significativas quantidades de linalol (36,9 % nas flores e 30,3 % nas folhas). Foram distinguidos dois quimiotipos: quimiotipo 1,8-cineol (Gambelas e Ancão) e quimiotipo 1,8-cineol/linalol (Quinta do Lago).

De acordo com Salgueiro (2007), os óleos essenciais de *T. albicans* são predominantemente cineólicos, tal como outros taxa da secção *Mastichina*, considerando-se uma característica desta secção.

Miguel *et al.* (2003) demonstraram a atividade antioxidante do óleo essencial de *T. albicans*, recorrendo a diversas metodologias, tendo concluído que este óleo poderia ser usado na indústria alimentar como antioxidante do óleo de girassol, podendo ser uma boa alternativa aos aditivos sintéticos usados para o mesmo fim.

Quanto às potencialidades antimicrobianas do óleo essencial de *T. albicans*, apenas foi testada a atividade antibacteriana (Faleiro *et al.*, 1999). Os resultados demonstraram a maior eficácia do óleo de *T. albicans* contra bactérias Gram-positivas

(*Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*) em relação ao *T. mastichina*, sendo por sua vez, este último, mais eficaz contra a bactéria gram-negativa (*Salmonella* sp.).

2.2.2. *Thymus lotocephalus*

2.2.2.1. Distribuição

Thymus lotocephalus G. Lopèz & R. Morales, é vulgarmente designado por erva-ursa ou tomilho-cabeçudo, é um endemismo lusitano, do sotavento algarvio (Morales, 2002). Em 1984, Morales descreveu *Thymus lotocephalus* como nova espécie, resolvendo as ambiguidades associadas ao seu sinónimo *Thymus cephalotus* L. referido em 1753 por Lineu no *Species Plantarum* (Morales, 1986).

O estado de conservação desta espécie está definido como Vulnerável, fazendo parte das espécies que enquadram o Plano Sectorial da Rede Natura 2000 (ICN, 2006). Encontra-se protegido legalmente como espécie prioritária e é abrangido pela Convenção de Berna (Convenção Relativa à Conservação da Vida Selvagem e do Meio Natural da Europa).

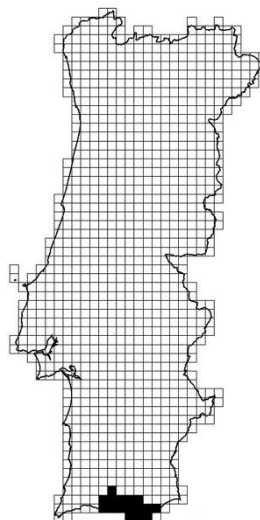


Figura 4. Distribuição em Portugal de *Thymus lotocephalus* G. Lopèz & R. Morales (Carapeto *et al.*, 2014a). Quadrícula UTM *standard* no datum WGS84 com 10 km de lado.

2.2.2.2. Descrição botânica

Trata-se de um subarbusto até 30 cm. Caules lenhosos procumbentes, com ramos ascendentes, erectos, herbáceos, muito folhosos, retrorso-pubescentes. Folhas subsésseis, 5-10 x 0,5-1 mm, lineares, herbáceas, revolutas, esparsamente pubescentes a

glabras, ciliadas. Inflorescências densas capituliformes, grandes, até 25 mm de diâmetro, com brácteas imbricadas. Brácteas até 20 x 10 mm, ovadas, planas, agudas, acuminadas, purpurascetes, ciliadas, pilosas na página inferior, glabras. Cálice 5-7 mm longo; tubo c. 2,5 mm longo, esparsamente pubescente; dentes superiores subiguais, normalmente não ciliados; dentes inferiores longamente ciliados. Corola até 20 mm longa, púrpurea, estreitamente tubulosa; lóbulos do lábio inferior c. 2mm longos, o superior bilobulado e mais curto (Salgueiro, 1994).

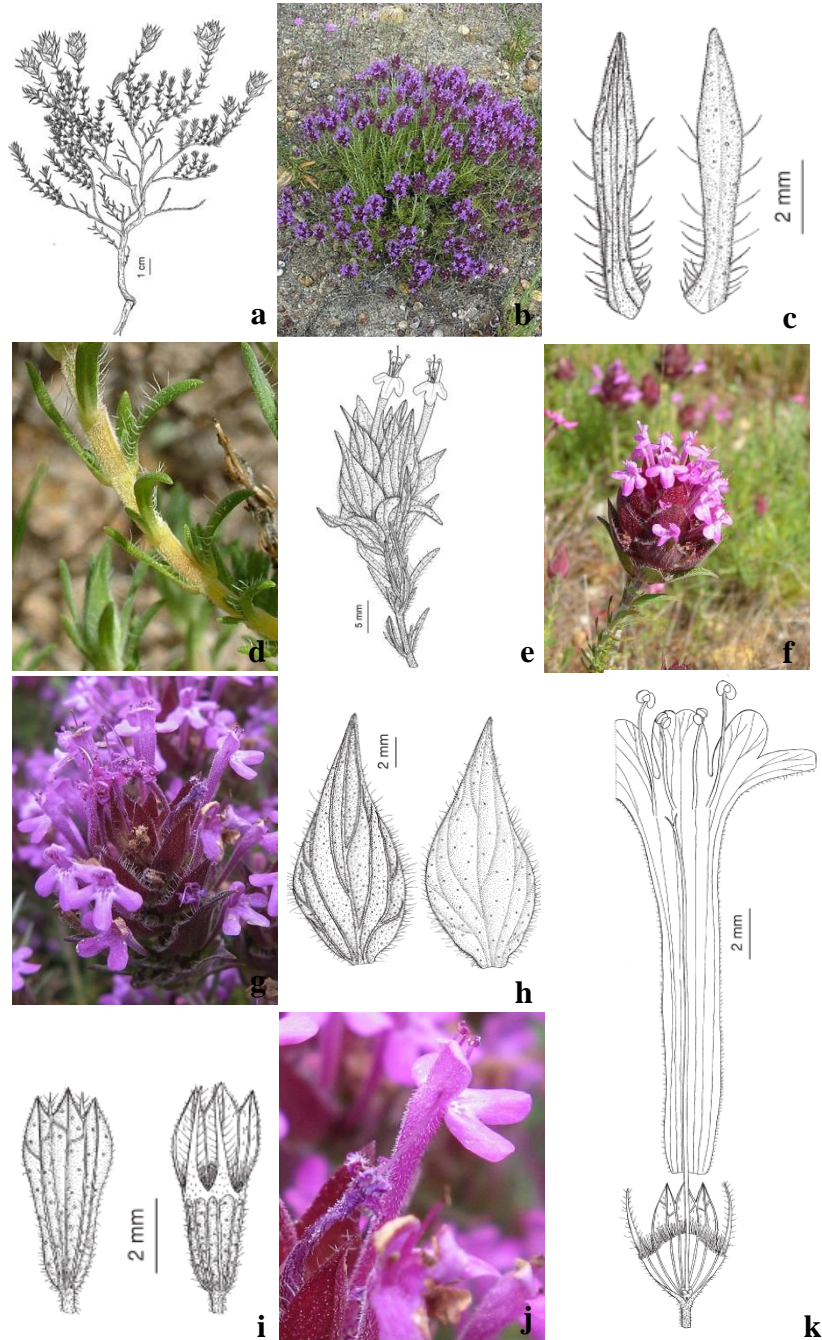


Figura 5. *Thymus lotocephalus* G. Lopèz & R. Morales **a)** desenho esquemático do hábito; **b)** planta no habitat natural; **c)** desenho esquemático das folhas, página inferior e superior; **d)** pormenor das folhas; **e)** desenho esquemático da inflorescência; **f)** inflorescência; **g)** pormenor das flores; **h)** desenho esquemático das brácteas, página inferior e superior; **i)** desenho esquemático do cálice em vista dorsal e ventral; **j)** corola em pormenor; **k)** desenho esquemático da corola e cálice abertos ventralmente. [Adaptado de Flora Ibérica e e Flora-On (Morales, 2010; Carapeto *et al.*, 2014b)]

2.2.2.3 Composição química e bioatividade do óleo essencial

A composição química do óleo essencial de *Thymus lotocephalus* foi referida pela primeira vez por Fernandes Costa (1945), que indicou o teor de 60% de 1,8-cineol. Mais tarde, Palhinha (1946) refere, para além do 1,8-cineol, o acetato de linalilo. Negueruela & Alonso (1986), confirmam os resultados de Fernandes Costa, quanto à composição maioritária em 1,8-cineol.

Salgueiro (1992), refere a presença de elevados teores de 1,8-cineol, cânfora, linalol, acetato de linalilo e α -pineno nos óleos essenciais de *T. lotocephalus* provenientes do Algarve. Figueiredo *et al.* (1993), usando plantas cultivadas no Jardim Botânico de Lisboa, obtiveram resultados diferentes para a composição do óleo obtido a partir das folhas ou das flores, sendo o primeiro constituído maioritariamente por acetato de linalilo e o segundo por 1,8-cineol.

Salgueiro (1994), aponta como constituintes principais do óleo essencial o 1,8-cineol, linalol e acetato de geranilo, distinguindo cinco quimiotipos: óleo essencial com elevada percentagem de linalol (24,6 %), epoxicariofileno (10,1%) e cânfora (9,8 %); óleo essencial com elevada percentagem de linalol e 1,8-cineol (13,9 % e 11,7 %); óleo essencial rico em 1,8-cineol (18,4 %); óleo essencial com acetato de linalilo, linalol e epoxicariofileno (16,1 %, 11,5 % e 10,6 %, respetivamente) e óleo essencial com elevada percentagem de acetato de geranilo (20,3 %).

Num estudo posterior, Figueiredo *et al.* (2001), analisaram os óleos essenciais obtidos por dois métodos distintos (hidrodestilação e destilação-extração) a partir das partes aéreas floridas e partes aéreas colhidas durante a fase vegetativa. Os resultados demonstraram que todos os óleos apresentam quantidades relativamente elevadas de 1,8-cineol, linalol e acetato de linalilo.

A atividade antibacteriana do óleo essencial de *T. lotocephalus* foi testada apenas pelo método da Difusão em Disco de Agar, contra *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus*, tendo este

demonstrado atividade, com sensibilidades diferentes dependendo do microrganismo (Faleiro *et al.*, 2003).

A atividade antioxidante foi avaliada por Costa *et al.* (2012), tendo o óleo essencial de *T. lotocephalus* revelado potencial antioxidante.

3. Objetivos

Este trabalho teve como principais objetivos contribuir para um melhor conhecimento das potencialidades de *Thymus albicans* e *Thymus lotocephalus*, duas espécies de tomilhos espontâneos de Portugal, nomeadamente:

- Comprovar algumas propriedades medicinais empiricamente reconhecidas nos óleos essenciais de tomilhos, pela realização de diversos testes de avaliação das atividades antifúngica e anti-inflamatória e respetivos mecanismos de ação;
- Avaliar a segurança da utilização dos óleos essenciais recorrendo a ensaios de viabilidade celular, utilizando diversas linhas celulares;
- Fomentar a valorização do património florístico-aromático da Flora Portuguesa, pelo uso racional dos óleos essenciais, tendo por base critérios de segurança e eficácia;
- Estabelecer e otimizar um protocolo para avaliar a fitotoxicidade de óleos essenciais.

4. Bibliografia

- Aubourg, S.T. (2011). Potential of Oregano and Thyme Essential Oils to Inhibit Lipid Damage Development during the Refrigerated Storage of Different Seafood Products. CIGR Section VI International Symposium on Towards a Sustainable Food Chain Food Process, Bioprocessing and Food Quality Management. Nantes, France.
- Balunas, M. J. & Kinghorn, A. D. (2005) Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences* 78: 431-441
- Barros, L., Heleno, S. A., Carvalho, A. M., & Ferreira, I. C. (2010). *Lamiaceae* often used in Portuguese folk medicine as a source of powerful antioxidants: Vitamins and phenolics. *LWT-Food Science and Technology*, 43(3), 544-550.
- Burt, S. (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology* 94: 223–253
- Camejo-Rodrigues, J., Ascensão, L., Bonet, M.A., Vallès, J. (2003) An ethnobotanical study of medicinal and aromatic plants in the Natural Park of "Serra de São Mamede" (Portugal). *Journal of Ethnopharmacology* 89: 199-209
- Canigual, S. & Vanaclocha B.V. (2000) Usos terapéuticos del tomillo. *Revista de Fitoterapia* 1: 5-13
- Carapeto, A., Pereira, A.J., Brás, L., Almeida, J. D., Schwarzer, U. (2014a). *Thymus lotocephalus* G.López & R.Morales – mapa de distribuição. Flora-On: Flora de Portugal Interactiva, Sociedade Portuguesa de Botânica. <http://www.flora-on.pt/#wThymus+lotocephalus>. Consulta realizada em 10/04/2014.
- Carapeto, A., Pereira, A.J., Ramalho, C. (2014b). *Thymus lotocephalus* G.López & R.Morales – fotografias. Flora-On: Flora de Portugal Interactiva, Sociedade Portuguesa de Botânica. <http://www.flora-on.pt/#wThymus+lotocephalus>. Consulta realizada em 10/04/2014.

- Carapeto A. & Pereira, A. J. (2014). *Thymus albicans* Hoffmanns. & Link – mapa de distribuição. Flora-On: Flora de Portugal Interactiva, Sociedade Portuguesa de Botânica. <http://www.flora-on.pt/#wThymus+albicans>. Consulta realizada em 10/04/2014.
- Costa, J.C., Aguiar, C., Capelo, J.H., Lousã, M., Neto, C. (1998). Biogeografia de Portugal Continental. *Quercetea* Vol. 0. Lisboa, Portugal
- Costa, P., Gonçalves, S., Grosso, C., Andrade, P. B., Valentão, P., Bernardo-Gil, M. G., & Romano, A. (2012). Chemical profiling and biological screening of *Thymus lotocephalus* extracts obtained by supercritical fluid extraction and hydrodistillation. *Industrial Crops and Products*, 36(1), 246-256.
- Douglas, M., Heyes, J., Smallfield, B. (2005). Herbs, spices and essential oils: post-harvest operations in developing countries. NZ Institute for Crop and Food Research Ltd. New Zealand (FAO).
- Faleiro, M.L., Miguel, G., Guerrero, C. and Brito, J. (1999) Antimicrobial activity of essential oils of *Rosmarinus officinalis* L., *Thymus mastichina* (L.) ssp. *mastichina* and *Thymus albicans* Hoffmanns. & Link. *Acta Horticulturae* 501, 45–48.
- Faleiro, M.L., Miguel, M.G., Ladeiro F., Venâncio, F., Tavares, R., Brito, J.C., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G. (2003) Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus* *Letters in Applied Microbiology* 36: 35–40
- Fernandes Costa, A. (1945). Subsídios para o estudo das plantas aromáticas Portuguesas. Algumas essências de *Thymus* L. (*T. zygis* subsp. *sylvestris*, *T. zygis* subsp. *zygis*, *T. mastichina*, *T. caespititius*, *T. capitellatus*, *T. villosus*). Tese de Doutoramento, Universidade de Coimbra, Portugal.
- Fernandes, J. (2001) Plantas Aromáticas e Medicinais no Parque Natural do Douro Internacional. Relatório de Estágio. Parque Natural do Douro Internacional, ICN.

- Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., Pedro, L. G., Pais, M. S. S., & Scheffer, J. J. (1993). The essential oils of two endemic Portuguese thyme species: *Thymus capitellatus* Hoffmanns. & Link and *T. lotocephalus* G. López & R. Morales. *Flavour and fragrance journal*, 8(1), 53-57.
- Figueiredo, A.C., Miguel, M.G., Duarte, A.M.F., Barroso, J.G., Pedro, L.G. (2001). Essential oil composition from *Thymus lotocephalus* G. López & R. Morales collected during flowering and vegetative phases. *Flavour & Fragrance Journal* 16: 417-21
- Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G. (Eds) (2007) Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais. *Curso Teórico-Prático*, pp. 1-18, 3a Ed., Edição da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa - Centro de Biotecnologia Vegetal, Lisboa, Portugal
- Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G., Salgueiro, L., Miguel, M.G., Faleiro, M.L. (2008) Portuguese *Thymbra* and *Thymus* Species Volatiles: Chemical Composition and Biological Activities. *Current Pharmaceutical Design* 14: 3120-3140
- Gómez-Estaca, J., López de Lacey, A., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, P. (2010). Biodegradable gelatin–chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. *Food Microbiology*, 27(7), 889-896.
- Gómez-Galera, S., Pelacho, A. M., Gené, A., Capell, T., & Christou, P. (2007). The genetic manipulation of medicinal and aromatic plants. *Plant Cell Reports*, 26(10), 1689-1715.
- Gonçalves, M. J., Vicente, A. M., Cavaleiro, C., & Salgueiro, L. (2007). Composition and antifungal activity of the essential oil of *Mentha cervina* from Portugal. *Natural product research*, 21(10), 867-871.

- González-Tejero, M. R., Casares-Porcel, M., Sánchez-Rojas, C. P., Ramiro-Gutiérrez, J. M., Molero-Mesa, J., Pieroni, A., ... & ElJohrig, S. (2008). Medicinal plants in the Mediterranean area: synthesis of the results of the project Rubia. *Journal of Ethnopharmacology*, 116(2), 341-357.
- Harley, R.M., Atkins, S., Budantsev, A., Cantino, P.D., Conn, B.J., Grayer, R., Harley, M.M., De Kok, R., Krestovskaja, T., Morales, R., Paton, A.J., Ryding, O. & Upson, T. (2004). Labiatae. In: Kubitzki, K. (Ed.), *The Families and Genera of Vascular Plants*, vol. 7. Springer Verlag, Berlin, pp. 167–275.
- ICN – Instituto da Conservação da Natureza (2006) Plano Sectorial da Rede Natura 2000, Flora.
- Medail, F. & Quèzel, P. (1999) Biodiversity Hotspots in the Mediterranean Basin: Setting Global Conservation Priorities. *Conservation Biology* 13, No. 6: 1510–1513
- Miguel, M.G., Figueiredo, A.C., Costa, M.M., Martins, D., Duarte, J., Barroso, J.G., Pedro, L.G. (2003). Effect of the volatile constituents isolated from *Thymus albicans*, *Th. mastichina*, *Th. carnosus* and *Thymbra capitata* in sunflower oil. *Nahrung/Food* 47, No. 6: 397 – 402
- Miguel, M.G., Duarte, F., Venâncio, F., Tavares, R. (2004a). Composition of the Essential Oils from Portuguese *Thymus albicans* Collected at Different Regions of Ria Formosa (Algarve). *Journal of Essential Oil Research* 16: 308-311
- Miguel, M.G., Duarte, F., Venâncio, F., Tavares, R. (2004b) Variation in the Main Components of the Essential Oils from the Leaves and Flowers of Portuguese *Thymus albicans* Over a Single Season. *J. Essent. Oil Res.* 16: 169-171
- Miguel, M.G., Costa, L.A., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G. (2007) Assessment of the antioxidant ability of *Thymus albicans*, *Th. mastichina*, *Th. camphoratus* and *Th. carnosus* essential oils by TBARS and Micellar Model systems. *Natural Product Communications* (Special Edition) 2: 399-406.

- Mittermeier, R.A., Gil, P.R., Hoffmann, M., Pilgrim, J., Brooks, T., Mittermeier, C.G., Lamoreux, J. and Da Fonseca, G.A.B. (2004) Hotspots Revisited: Earth's Biologically Richest and Most Endangered Terrestrial Ecoregions. University of Chicago Press for Conservation International.
- Morales, R. (1986) Taxonomia de los generos *Thymus* (excluida la sección *Serpyllum*) y *Thymbra* en la Peninsula Iberica. *Ruiza* 3, 1-324
- Morales, R. (2002). The history, botany and taxonomy of the genus *Thymus*. In: Stahl-Biskup, E. & Sáez, F. (Eds). Thyme: The genus *Thymus*. pp. 1-43 Taylor & Francis, London.
- Morales, R. (2010) In: Castroviejo, S. *et al.* (Eds.) (1986-2014). Flora Iberica. Plantas vasculares de la Península Ibérica, e Islas Baleares. Real Jardín Botánico, CSIC. Madrid.
- Negueruela, A.V. & Alonso, M.J.P. (1986). Aceites esenciales de tomillos ibéricos. IV. Contribución al estudio quimiotaxonómico (Terpenides) del género *Thymus* L. Trab. Dep. Botánica 13: 115-133. Madrid
- Palhinha, R.T. (1946) Plantas aromáticas de Portugal. *Bróteria* 15, 93-113
- Pereira, A. J. (2014). *Thymus albicans* Hoffmanns. & Link – fotografias. Flora-On: Flora de Portugal Interactiva, Sociedade Portuguesa de Botânica. <http://www.flora-on.pt/#wThymus+albicans>. Consulta realizada em 10/04/2014.
- Proença da Cunha, A. & Roque, O. (2010) A Farmacognosia nos Estudos Farmacêuticos cap. 1 pp. 4-15. In: Proença da Cunha, A. (coord.) Farmacognosia e Fitoquímica. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa
- Raskin, I. *et al.* (2002) Plants and human health in the twenty-first century. *Trends in Biotechnology* 20 (12): 522-531

- Salgueiro, L. R. (1992) Essential oils of endemic *Thymus* species from Portugal. *Flavour Fragr. J* 7: 159-9
- Salgueiro, L. R. (1994). Os tomilhos portugueses e seus óleos essenciais. Tese de Doutoramento. Universidade de Coimbra. Coimbra.
- Salgueiro, L.R., Vila, R., Tomàs, X., Canigüeral, S., Proença da Cunha, A., Adzet, T. (1997) Composition and Variability of the Essential Oils of *Thymus* Species from Section *Mastichina* from Portugal. *Biochemical Systematic sand Ecology* 25, No.7: 659-672
- Salgueiro, L.R., Vila, R., Tomàs, X., Canigüeral, S., Paiva, J., Proença da Cunha, A., Adzet, T. (2000) Essential oil composition and variability of *Thymus lotocephalus* and *Thymus x mourae*. *Biochemical Systematics and Ecology* 28: 457-470
- Salgueiro, L.R. (2007) Os Tomilhos de Portugal. In: A. C. Figueiredo, J. G. Barroso, L. G. Pedro (Eds) *Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais*. Curso Teórico-Prático, Edição Centro de Biotecnologia Vegetal – Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal (3ª Edição ISBN: 978-972-9348-16-7).
- Santos, C. (2000) *As Plantas Aromáticas e Medicinais no Parque Natural do Douro Internacional – Miranda do Douro*. Mogadouro, Parque Natural do Douro Internacional, ICN
- Santos-Gomes, P. C., & Fernandes-Ferreira, M. (2001). Organ-and season-dependent variation in the essential oil composition of *Salvia officinalis* L. cultivated at two different sites. *Journal of agricultural and food chemistry*,49(6), 2908-2916.
- The Nature Conservancy (2011) *Saving Mediterranean Habitats Worldwide*.
- Wachtel-Galor, S. & Benzie, I. F. F. (2011) *Herbal Medicine: An Introduction to its History, Usage, Regulation, Current Trends, and Research Needs* cap.1 pp.1-10

In: Herbal Medicine: Biomolecular and clinical aspects. CRC Press, Taylor & Francis Group, New York

WHO (2011) The world medicines situation 2011: traditional medicines: global situation, issues and challenges. Geneva. 12p.

Zuzarte, M. R. (2013) Portuguese lavenders: evaluation of their potential use for health and agricultural purposes. Tese de doutoramento. Universidade de Coimbra. Coimbra, Portugal.

II. ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

1. Introdução

Os fungos constituem um grupo de organismos eucarióticos, heterotróficos, crescendo na forma micelial e leveduriforme, adaptados a uma grande diversidade de ambientes e representados por um elevado número de espécies, aos quais estamos expostos diariamente (Deacon, 2006a). Algumas espécies evoluíram no sentido de superar os mecanismos de resistência inata dos indivíduos, utilizando-os como fonte de nutrientes pelo estabelecimento de uma relação de comensalismo benigno, com muitos dos genes envolvidos nesta co-evolução a codificar componentes da parede celular e aspetos da morfologia dos fungos (Hube, 2009).

Dos cerca de 200 fungos identificados como patogénicos para humanos a grande maioria são oportunistas, causando infeção apenas em situações de disrupção da barreira protetora da pele e mucosas, desequilíbrio da microflora devido a alterações fisiológicas do hospedeiro ou comprometimento das funções imunitárias (van Burik & Magee, 2001). Podem tratar-se de fungos da microflora humana, que até aí cresciam de forma controlada, ou de fungos saprófitas cujos propágulos infecciosos, naturalmente presentes no ambiente, transitam para formas parasíticas (Sullivan *et al.*, 2005).

Com maior virulência, os fungos primários são capazes de infetar indivíduos imunocompetentes e imunocomprometidos (com maior severidade) e, devido à sua elevada prevalência em localizações geográficas muito específicas, as infeções a eles associadas são comumente designadas por micoses endémicas (Murray *et al.*, 2013a). Todos os agentes etiológicos deste tipo de micoses são fungos saprófitas e a transição para a fase parasítica ocorre, geralmente, quando os seus esporos ou células são fagocitados pelos macrófagos alveolares, após inalação (Graybill *et al.*, 2007).

A profundidade das infeções fúngicas, amplamente designadas por micoses, varia consoante o seu agente etiológico e o estado imunológico do hospedeiro, classificando-se como superficiais, quando confinadas às camadas externas do epitélio, ou invasivas, quando o agente patogénico é capaz de ultrapassar essa barreira disseminando-se sistemicamente e/ou causando infeções metastáticas, como são a endocardite, osteomielite e meningite (Murray *et al.*, 2013a).

As infeções fúngicas superficiais constituem o grupo de micoses mais numeroso e disseminado, com a percentagem da população mundial afetada a atingir os 20-25%, estando os seus principais agentes distribuídos pelos géneros *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton* (Havlickova *et al.*, 2008).

Nos últimos anos, tem vindo a ocorrer um forte aumento da incidência e severidade das infeções fúngicas invasivas por todo o mundo (Lass-Flörl, 2009; Pfaller *et al.*, 2010; Sifuentes-Osornio *et al.*, 2012; Liao *et al.*, 2013). Na maioria dos casos são atribuídas a fungos oportunistas dos géneros *Candida* e *Aspergillus*, afetando essencialmente a população crescente de indivíduos imunocomprometidos (Binder & Lass-Flörl, 2011). Destes fazem parte, por exemplo, os indivíduos com patologias imunossupressoras, como é o síndrome de imunodeficiência adquirida, e aqueles cuja patologia/condição clínica exige a aplicação de terapêutica imunossupressora, são exemplos a quimioterapia no tratamento do cancro, por ser indutora de neutropenia severa, e a terapia moduladora do sistema imunológico em doentes transplantados e com doenças auto-imunes (Arthington-Skaggs & Rex, 2008; Neofytos *et al.*, 2010; Martínez-Martínez *et al.*, 2012; Lewis *et al.*, 2013).

Além disso, paradoxalmente relacionado com os avanços da medicina, está o crescimento da taxa de infeções invasivas adquiridas em contexto hospitalar, que se ficam a dever ao aumento do número de pacientes em estado crítico, com internamentos cada vez mais prolongados, durante os quais se aplicam procedimentos médicos invasivos (e.g. nutrição parenteral e cateterização) e terapias com antibióticos de largo-espectro, factores potenciadores do desenvolvimento de infeções fúngicas (Arthington-Skaggs & Rex, 2008). Os recém nascidos, pelo seu imaturo sistema imunitário, constituem também um grupo de risco (Steinbach, 2010).

Estudos epidemiológicos recentes evidenciam que a escassez de alternativas para a terapia antifúngica que aliem eficácia e reduzida toxicidade tem levado ao uso extensivo de um número limitado de agentes terapêuticos no tratamento e profilaxia das infeções fúngicas invasivas, conduzindo à emergência de resistência entre os principais agentes etiológicos que, paralelamente com o diagnóstico tardio, representa a principal razão apontada para as elevadas taxas de mortalidade (40 a 90%) e morbidade associadas às infeções fúngicas invasivas (Srinivasan *et al.*, 2014; Alcazar-Fuoli & Mellado, 2014).

Os antifúngicos convencionais mais relevantes na prática clínica são frequentemente divididos em classes de acordo com os seus alvos moleculares e mecanismos de ação. Os antifúngicos clássicos, como os polienos (e.g. anfotericina B, nistatina), derivados azólicos (e.g. fluconazol, itraconazol voriconazol, clotrimazol e miconazol) e alilaminas (e.g. terbinafina e naftifina), atuam ao nível do ergosterol, principal componente esteróide da membrana dos fungos, alterando a fluidez e

permeabilidade da membrana fúngica (Abu-Elteen & Hamad, 2005). Outros mais recentes, como as equinocandinas (e.g. caspofungina) atuam por inibição da ação de enzimas fundamentais em determinadas etapas da cascata de síntese de constituintes fundamentais da parede celular dos fungos (Murray *et al.*, 2013b).

Associada aos seus mecanismos de ação, está a elevada toxicidade para os humanos de alguns dos fármacos antifúngicos de primeira escolha. No caso da anfotericina B, a sua nefrotoxicidade deve-se sobretudo à ligação ao colesterol da membrana celular humana, devido à falta de especificidade para o ergosterol, que é o seu alvo (Murray *et al.*, 2013b). Já o fluconazol, apesar de apresentar reduzida toxicidade quando comparado com outros derivados azólicos associados a toxicidade gástrica e hepática, não é ativo contra fungos filamentosos e é pouco indicado em doentes polimedicados, como são aliás a maioria dos doentes com risco de infeção fúngica, devido à sua natureza fungistática e interação com as enzimas do citocromo P450, envolvidas na metabolização de diversos fármacos (Srinivasan *et al.*, 2014).

De seguida apresentam-se, de forma mais pormenorizada em termos de epidemiologia e etiologia, as principais infeções fúngicas invasivas e superficiais que afetam a população mundial, com indicação sobre os principais agentes terapêuticos usados no seu tratamento e resistência ou redução de susceptibilidade associadas.

1.1. Candidíases

As infeções por *Candida spp.* constituem a causa mais frequente de infeções fúngicas invasivas em todo o mundo. Os resultados de um estudo epidemiológico realizado em diferentes localizações geográficas ao longo de dez anos (*ARTEMIS DISK global antifungal surveillance study*, 1997-2007) revelou que, de um modo geral, as seis principais espécies responsáveis por candidíases invasivas são, por ordem de frequência de isolamento, a *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. guilliermondii* (Pfaller *et al.*, 2010). Um estudo epidemiológico realizado em Portugal destaca a elevada taxa de mortalidade associada a infeções sistémicas por *Candida spp.* adquiridas em contexto hospitalar (Costa-de-Oliveira *et al.*, 2008).

Entre as candidíases superficiais mais comuns encontra-se a candidíase vulvovaginal que afeta 70-75% das mulheres pelo menos uma vez durante a sua vida, das quais 40-45% sofrerão de infeção recorrente, sendo o seu principal agente etiológico a *Candida albicans*, seguida da *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (Palmeira-de-

Oliveira, 2009). De referir ainda, a candidíase orofaríngea e a onicomicose por *Candida* spp., que afetam cerca de 90% e 20% dos doentes infetados por HIV, respetivamente (Arthington-Skaggs & Rex, 2008; Jayatilake *et al.*, 2009; Rautemaa & Ramage, 2011).

A patogenicidade das espécies de *Candida* está, principalmente, relacionada com a organização em biofilmes e formação do tubo germinativo. Os biofilmes promovem a expressão de genes de resistência, protegem as leveduras da resposta imunológica do hospedeiro e conferem resistência à terapia antifúngica por limitação da penetração do fármaco através da matriz extracelular que envolve as células (Palmeira-de-Oliveira, 2009; Murray *et al.*, 2013a). A capacidade de transitar para formas filamentosas (dimorfismo) pela formação de um tubo germinativo, além de conferir resistência aumentada à fagocitose, é considerado o fator de maior relevância para a invasão dos tecidos, particularmente importante nas infeções por *C. albicans*, pois as suas hifas exibem uma sensibilidade ao toque (trigmotropismo) que facilita o crescimento do filamento ao longo de depressões e poros da superfície epitelial e subsequente infiltração em camadas mais profundas (Murray *et al.*, 2013a).

A anfotericina B foi, durante muito tempo, o principal antifúngico usado no tratamento de candidíases sistémicas, no entanto, devido à sua elevada toxicidade foi parcialmente substituído pelo fluconazol, que apresenta também um largo espectro de ação sendo menos tóxico (Ruhnke *et al.*, 2008). O seu uso intensivo, bem como de outros derivados azólicos, quer no tratamento quer na profilaxia em indivíduos identificados como população de risco, levou ao desenvolvimento de resistência e/ou reduzida susceptibilidade sobretudo entre as espécies “não-*albicans*”, com comprovada resistência cruzada ao voriconazol (Pfaller *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2012; Binder & Lass-Flörl, 2011).

1.2. Criptococoses

A criptococose é, geralmente, iniciada no trato pulmonar por inalação de propágulos infecciosos (esporos ou células) de *Cryptococcus neoformans* (presente em excrementos de aves, principalmente de pombos cosmopolitas) ou *Cryptococcus gatii*, (presente em madeira e outros materiais vegetais em decomposição) (Del Poeta & Casadevall, 2012).

Os principais grupos de risco são os doentes infetados por HIV, receptores de transplantes e outros indivíduos imunocomprometidos, no entanto, indivíduos aparentemente imunocompetentes também podem ser infetados (Bratton *et al.*, 2012).

Em 40-86% dos casos a criptococose acaba por resultar em infeção cerebral ou meningite, esta última com mais de 1 milhão de casos e 600.000 mortes por ano (Sloan, & Parris, 2014). Nos casos em que se tornam invasivas, sem tratamento são inevitavelmente fatais (Deacon, 2006b). A principal opção terapêutica consiste em terapia combinada com anfotericina B e flucitosina seguida de manutenção com fluconazol, com taxas de sucesso entre 50 a 80% (Binder & Lass-Flörl, 2011; Bratton *et al.*, 2013).

Resultados de um estudo epidemiológico do projeto acima referido, *ARTEMIS DISK global antifungal surveillance study*, demonstram que o *C. neoformans* é a espécie com maior taxa de isolamento, sendo responsável por cerca de 30% das infeções por leveduras não-*Candida*, a agravar este facto existe também uma tendência crescente para o desenvolvimento de resistência ao fluconazol por parte desta espécie (Pfaller *et al.*, 2009).

1.3. Aspergiloses

Os *Aspergillus* spp. são fungos saprófitas capazes de gerar infeção em humanos, tendo como principal via de infeção a inalação dos seus esporos (Murray *et al.*, 2013a). Entre as espécies mais frequentes, está o *A. fumigatus*, responsável por cerca de 90% das infeções, seguido de *A. flavus*, *A. terreus* e *A. niger* (Hadrich *et al.*, 2012).

Constituem os principais agentes das infeções fúngicas invasivas oportunistas por fungos filamentosos em todo o mundo (Binder & Lass-Flörl, 2011). São comuns, síndromas alérgicos promovidos pelas suas toxinas (aspergilose broncopulmonar alérgica) em doentes asmáticos ou com fibrose cística e outras manifestações clínicas, como o aspergiloma resultante da colonização de áreas afetadas do pulmão, que podem também afetar indivíduos imunocompetentes (Sullivan *et al.*, 2005).

Estudos recentes sobre a epidemiologia das infeções fúngicas invasivas na Europa, demonstram o aumento da incidência das aspergiloses invasivas em relação às candidíases invasivas em algumas populações (Lass-Flörl, 2009). Esta mudança representa um motivo de grande preocupação uma vez que, sem tratamento, as taxas de mortalidade associadas às aspergiloses podem atingir os 80-90% e variam entre cerca de

30-40%, dependendo do antifúngico usado (Hadrich *et al.*, 2012).

Os derivados azólicos, itraconazol, posaconazol e voriconazol, são os antifúngicos mais usados no tratamento e profilaxia das aspergiloses, tendo sido reportada diminuição da susceptibilidade a todos eles e resistência cruzada ao posaconazol e voriconazol entre estirpes resistentes a itraconazol, como as de *A. flavus* e *A. fumigatus* (Pfaller *et al.*, 2011). Existem evidências de que o uso excessivo de azóis na agricultura possa estar na origem deste fenómeno (Binder & Lass-Flörl, 2011).

As aflotoxinas produzidas pelos *Aspergillus* spp. constituem uma das principais classes de micotoxinas responsáveis pela contaminação de produtos alimentares ao longo das diversas etapas da sua cadeia de produção, tendo um elevado impacto na segurança alimentar, rendimento agrícola e pecuário (Zuzarte *et al.*, 2014). Da exposição a aflotoxinas decorrem riscos para a saúde humana, como a hepatotoxicidade, imunossupressão, aumento da probabilidade de desenvolvimento de cancro e nanismo em crianças (Tran-Dinh., 2013).

1.4. Dermatofitoses

De um modo geral, as dermatofitoses são infeções causadas por fungos dermatófitos (distribuídos pelos géneros *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Tricophyton*) que, por produzirem queratinases e outras enzimas queratolíticas, degradam tecido queratinoso gerando infeções na pele, cabelo e unhas (Weitzman & Summerbell, 1995; Zuzarte *et al.*, 2011b). Tratam-se, maioritariamente, de infeções superficiais não-invasivas pouco severas, no entanto, em indivíduos imunocomprometidos podem disseminar-se para camadas mais profundas da pele e outros órgãos, progredindo para infeções invasivas (Venturini *et al.*, 2012). Nestes indivíduos, reações exacerbadas aos produtos metabólicos fúngicos podem originar lesões que servem de ponto de entrada para outros organismos patogénicos, originando infeções secundárias potencialmente fatais (Deacon, 2006b).

Os dermatófitos capazes de infetar humanos podem corresponder a espécies que coexistem de forma benigna na pele (antropofílicos), espécies que colonizam animais (zoofílicos) ou espécies naturalmente presentes no solo (geofílicos). As espécies antropofílicas são transmitidas diretamente entre humanos e as zoofílicas (e.g. *Microsporum canis*) entre humanos e animais, além disso o contacto com objetos infetados promove a sua transmissão indireta (Zuzarte *et al.*, 2011b).

Os agentes etiológicos das dermatofitoses variam, substancialmente, de acordo com a localização anatômica da infecção, no entanto, entre os mais comuns estão o *T. rubrum*, *T. mentagrophytes var. interdigitale*, *M. canis* e *E. floccosum*, tendo em conta a sua ampla distribuição geográfica (Seebacher *et al.*, 2008; Ameen, 2010).

As manifestações clínicas com maiores taxas de incidência são a tinea unguium (onicomicose) e tinea pedis (vulgo pé-de-atleta) associadas principalmente a *T. rubrum*, e outras espécies como o *T. mentagrophytes var interdigitale*, *E. floccosum*, *M. gypseum* e *T. verrucosum* (Havlickova *et al.*, 2008; Ameen, 2010).

Para o seu tratamento, são usados antifúngicos da classe das alilaminas e dos azóis, de uso tópico (e.g. naftifina e miconazole) e sistêmico (e.g. terbinafina e itraconazol). A opção por terapia sistêmica ou combinada ocorre, principalmente, nos casos de infecção crônica em que o tratamento com agentes tópicos é mal sucedido ou quando a infecção atinge uma grande extensão (Grupta & Cooper, 2008).

A grande semelhança partilhada pelos fungos e seus hospedeiros, torna a redução da toxicidade aliada a eficácia e largo espectro de ação um dos maiores desafios no desenvolvimento de novos agentes antifúngicos, tendo levado à intensificação de programas de *screening* de produtos naturais como fonte de alternativas terapêuticas. Neste seguimento, diversos estudos têm evidenciado o potencial dos óleos essenciais na terapia antifúngica, tendo sido comprovada a sua atividade contra um largo espectro de fungos patogênicos (e.g. Nguefack *et al.*, 2004; Bakkali *et al.*, 2008; Palmeira-de-Oliveira *et al.*, 2009; Zuzarte *et al.*, 2011b; Tabassum & Vidyasagar, 2013).

Alguns estudos demonstram que a resistência a antifúngicos convencionais não influencia a susceptibilidade dos fungos aos óleos essenciais e que a terapia combinada resulta em efeitos aditivos ou sinérgicos, sugerindo a atuação dos óleos essenciais por mecanismos de ação alternativos à interferência na produção de elementos da parede e membrana/parede celular dos fungos, principal mecanismo de ação dos antifúngicos convencionais (Pinto *et al.*, 2009; Amber *et al.*, 2010; Khan & Ahmad, 2011; Silva *et al.*, 2011; Palmeira-de-Oliveira *et al.*, 2013). A possibilidade de exploração de novos e múltiplos alvos celulares é um fator chave para o aumento da eficácia com redução da toxicidade e abrandamento do desenvolvimento de resistência por parte dos principais agentes etiológicos das infecções fúngicas, vindo reforçar o enorme potencial dos óleos

essenciais na terapia antifúngica (Gauwerky, 2009).

Diversos estudos têm sustentado cientificamente as evidências tradicionais relativas ao potencial antifúngico de óleos essenciais de tomilhos portugueses e seus compostos maioritários, comprovando a sua eficácia e reduzida toxicidade a concentrações fungicidas ou fungistáticas para um grande número de fungos patogênicos, principalmente no que aos tomilhos fenólicos diz respeito (Pina-Vaz *et al.*, 2004; Pinto *et al.*, 2006; Figueiredo *et al.*, 2008; Gonçalves *et al.*, 2010).

Por conseguinte, considerou-se importante contribuir para a ampliação deste conhecimento, apresentando-se um estudo de determinação da atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Thymus albicans* e *Thymus lotocephalus* contra estirpes de *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, dermatófitos e *Aspergillus* spp.. Os seus respetivos compostos maioritários (1,8-cineol, linalol, borneol, α -terpineol e óxido de cariofileno) foram testados isoladamente a fim de determinar a sua influência na atividade do óleo essencial. Tendo ainda como objetivo o esclarecimento do mecanismo de ação, realizaram-se ensaios de inibição da formação do tubo germinativo e de avaliação da função mitocondrial em células de levedura, quando expostas às concentrações sub-inibitórias dos óleos e/ou compostos maioritários.

2. Material e Métodos

Os ensaios de determinação da atividade antifúngica dos óleos essenciais e seus compostos majoritários tiveram lugar no Laboratório de Farmacognosia/Centro de Estudos Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

2.1. Material Vegetal

O material vegetal foi colhido durante a época de floração, no Algarve. Foram colhidas partes aéreas floridas de *T. lotocephalus* na região do Ludo e no caso do *T. albicans* na zona da lagoa de Almargem.

2.2. Isolamento dos óleos essenciais e análise

Os óleos essenciais foram isolados por hidrodestilação num aparelho tipo Clevenger modificado, descrito na Farmacopeia Europeia (Council of Europe, 2010), e calculado o respectivo rendimento em óleo essencial.

Estudos prévios realizados no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra permitiram avaliar o perfil químico dos óleos essenciais por cromatografia gás-líquido e por cromatografia gás-líquido acoplada à espectrometria de massa.

A tabela I sistematiza o rendimento em óleo essencial e os principais compostos identificados nas espécies em estudo.

2.3. Compostos puros e de referência

Utilizaram-se padrões (compostos de pureza superior a 95%) obtidos comercialmente dos principais compostos identificados nos óleos essenciais, nomeadamente, 1,8-cineol (Merck), linalol (Aldrich), α -terpineol (Sarsynthese), borneol (Fluka) e óxido de cariofileno (Sigma) .

Os antifúngicos convencionais testados foram o Fluconazol (Pfizer) e a Anfotericina B (Sigma, 80.0 % de pureza).

Tabela I. Rendimento e compostos maioritários dos óleos essenciais de *Thymus albicans* e *Thymus lotocephalus*.

Óleos essenciais	Rendimento	Compostos maioritários	Local de colheita
<i>Thymus albicans</i>	2,4 %	1,8-cineol (40,5 %) linalol (25 %) borneol (9,4 %) α -terpineol (4,5 %)	Lagoa de Almagem, Algarve, Portugal
<i>Thymus lotocephalus</i>	0,9 %	linalol (19,5 %) 1,8-cineol (10,8 %) óxido de cariofileno (10,9%)	Região do Ludo, Algarve, Portugal

2.4 Estirpes fúngicas testadas e seu cultivo

A atividade antifúngica dos óleos essenciais e seus compostos maioritários foi determinada contra estirpes de leveduras (*Candida* spp. e *Cryptococcus neoformans*) e fungos filamentosos (dermatófitos e *Aspergillus* spp.) isoladas de casos clínicos e provenientes de culturas de referência da *American Type Culture Collection* (ATCC) e *Collección Española de Cultivos Tipo* (CECT), com diferentes padrões de resposta a drogas antifúngicas convencionais, como o Fluconazol e a Anfotericina B.

Foram testadas três estirpes de referência do género *Candida* (*C. albicans* ATCC 10231, *C. tropicalis* ATCC 13803 e *C. parapsilosis* ATCC 90018); duas estirpes isoladas de casos clínicos de candidíase vulvovaginal recorrente (*C. krusei* H9 e *C. guilliermondii* MAT 23) e uma estirpe de referência de *Cryptococcus neoformans* (*C. neoformans* CECT 1078).

Os dermatófitos testados distribuem-se por três géneros, sendo três estirpes clínicas isoladas de unhas e pele (*Trichophyton mentagrophytes* FF7, *Microsporum canis* FF1, *Epidermophyton floccosum* FF9) e cinco estirpes de referência (*T. rubrum*

CECT 2794, *M. gypseum* CECT 2908, *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* CECT 2958, e *T. verrucosum* CECT 2992).

Uma das estirpes de *Aspergillus* testada é uma estirpe clínica isolada de secreções brônquicas (*A. flavus* F44) e duas são estirpes de referência (*A. niger* ATCC 16404 e *A. fumigatus* ATCC 46645).

Todas as estirpes foram armazenadas em meio SDA (Saboraud Dextrose Agar) com 20 % de glicerol a -80°C e sub-cultivadas antes de cada ensaio em meio SDA e PDA (Potato Dextrose Agar), em caixas de Petri, para as leveduras, e em tubos de vidro de meio inclinado, para os fungos filamentosos, de forma a assegurar as suas condições de crescimento óptimo e pureza. A incubação realizou-se em estufa estática durante as 24/48 horas que precedem o ensaio para as estirpes de *Candida* spp. e *Aspergillus* spp./*Cryptococcus neoformans* a 35°C e durante 7 dias a 30°C para as estirpes de dermatófitos.

Nos ensaios de susceptibilidade e de viabilidade, utilizou-se o meio líquido RPMI 1640 (Sigma) sem bicarbonato, com L-glutamina e vermelho fenol como indicador de pH, tamponizado com MOPS [ácido 3-(N-morfolino)-propanossulfônico] na concentração final de 0,165 mol mL⁻¹, ajustado a pH 7 com uma solução de NaOH 5M (hidróxido de sódio) e esterilizado por filtração em membrana de 0,22 µm (millipore).

Para o ensaio de inibição do tubo germinativo utilizou-se o meio líquido NYP composto por 10 mol L⁻¹ de *N-acetyl-D-glucosamine* (Sigma), 3.35 g L⁻¹ de *Yeast Nitrogen Base* (Difco), 10-3 mol L⁻¹ de Prolina (Fluka) e 4.5 g L⁻¹ de NaCl (cloreto de sódio), ajustado a pH 6.7 ± 0.1 com uma solução de NaOH 1M (Marichal et al., 1986) e esterilizado por filtração em membrana 0,22µm (millipore).

Os restantes reagentes utilizados foram obtidos da Sigma-Aldrich.

2.5. Atividade antifúngica

Determinaram-se, para as duas amostras de óleos essenciais e seus compostos maioritários, a concentração mínima inibitória (MIC) e a concentração mínima letal (MLC), segundo o método de referência para a realização de testes de susceptibilidade de fungos à terapia antifúngica em meio líquido do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), de acordo com os protocolos M27-A3 (CLSI, 2008a) para leveduras e M38-A2 (CLSI, 2008b) para fungos filamentosos. Selecionou-se o macrométodo por

este permitir a utilização de tubos de ensaio de vidro eliminando-se a possibilidade de ocorrência de interações entre os óleos essenciais e o plástico de que são constituídas as placas de micropoços, nas quais se realiza o micrométodo.

O desenho experimental consistiu numa bateria de tubos de vidro estéreis de 12 x 55 mm, com cada uma das condições a testar em duplicado, para cada estirpe fúngica, contendo: um controlo de esterilidade do meio (controlo negativo); um controlo de crescimento e viabilidade do fungo em DMSO (dimetil sulfóxido), numa concentração final que não exceda 2% (v/v), e uma série de diluições dos óleos essenciais ou compostos maioritários num intervalo definido de concentrações.

Momentos antes da sua utilização, diluíram-se os compostos a testar em DMSO, a partir dos seus concentrados armazenados a 4° C. Escolheu-se o DMSO como solvente por este ser usado na diluição dos fármacos antifúngicos convencionais, que servem para avaliar a sensibilidade dos microorganismos.

Prepararam-se as suspensões de inóculo em tubos de vidro, numa solução de soro fisiológico estéril a 0,9% (9 g L⁻¹ de NaCl) a partir de sub-culturas puras e viáveis em SDA ou PDA, sujeitas ao tempo de incubação acima descrito. Para a preparação dos inóculos de leveduras escolheram-se as colónias mais recentes, a densidade das suspensões celulares foi ajustada visualmente à escala padrão de 0,5 Unidades de MacFarland e confirmada espectrofotometricamente a equivalência da absorvância desta em relação à solução-padrão, para a obtenção de uma concentração final de (1-2)x10³ células mL⁻¹. Na preparação dos inóculos dos fungos filamentosos, os esporos foram recolhidos por agitação em vórtex com pérolas de vidro estéreis e a densidade da suspensão de esporos foi ajustada por contagem em câmara de Neubauer para a obtenção de uma concentração final de (1-2)x10⁴ células mL⁻¹. Dada a hidrofobicidade dos esporos de *Aspergillus* spp., utilizou-se uma gota de Tween 20 estéril para permitir a sua suspensão.

Diluíram-se, em tubos falcon estéreis, as suspensões iniciais de inóculo numa proporção de 1:500 em meio RPMI. Distribuíram-se 800 µL do meio RPMI inoculado, pelos tubos de controlo positivo e pelos tubos contendo um volume de 16,3 µL das diluições dos óleos essenciais/constituintes maioritários, obtendo-se um intervalo de concentrações de teste entre 0,08 e 20 µL mL⁻¹.

Incubaram-se os tubos de ensaio, aerobiamente em estufa estática, durante 48/72 horas a 35°C para as estirpes de *Candida* spp. e *Aspergillus* spp./*Cryptococcus neoformans* e durante 7 dias a 30°C para as estirpes de dermatófitos. Após este tempo,

procedeu-se à leitura para a determinação do valor de MIC, pela verificação visual da ocorrência ou não de crescimento por comparação com o controlo positivo e negativo. Comprovada a esterilidade do meio RPMI e o crescimento nos tubos de controlo positivo, seguiu-se a leitura por ordem crescente de concentração de óleo essencial/composto maioritário, correspondendo o valor de MIC à concentração mínima capaz de inibir totalmente o crescimento da estirpe fúngica.

Dos tubos onde não ocorreu crescimento visível, plaquearam-se alíquotas de 20 μL da suspensão homogeneizada (de cada uma das réplicas), em caixas de Petri de meio SDA, mediante as condições e tempos de incubação descritas para o ensaio de determinação de MIC. Realizou-se a leitura dos resultados pela confirmação visual da ocorrência ou não de crescimento, correspondendo o valor de MLC à concentração mínima de composto que, além de inibir, é letal para a estirpe fúngica em teste.

Os valores de MIC e MLC são expressos em $\mu\text{L mL}^{-1}$ (v/v), resultam de três ensaios independentes, realizados em duplicado e repetidos sempre que se verificaram discordâncias nos resultados obtidos. Nos casos em que, após um número significativo de repetições, se verificaram padrões de oscilação, apresentou-se o resultado em forma de intervalo de valores de concentração.

2.6. Mecanismo de ação

2.6.1. Inibição do tubo germinativo

Determinou-se o efeito dos óleos essenciais e seus compostos maioritários na formação do tubo germinativo de *Candida albicans* ATCC 10231.

O desenho experimental consistiu numa bateria de tubos de vidro estéreis de 12 x 55 mm, com cada uma das condições a testar em duplicado, contendo um controlo de crescimento em DMSO numa concentração de 10 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (controlo positivo) e uma série de diluições dos óleos essenciais ou compostos maioritários, partindo do valor de MIC, previamente determinado, até MIC/64.

Momentos antes da sua utilização, diluíram-se os compostos a testar em DMSO (nunca excedendo a concentração final 1% (v/v)), a partir dos seus concentrados armazenados a 4° C.

As suspensões celulares foram preparadas a partir de sub-culturas puras e viáveis em SDA, deixadas a crescer *overnight* aerobiamente em estufa estática a 35 °C,

em tubos de vidro estéreis em meio NYP. A densidade das suspensões celulares foi ajustada visualmente à escala padrão de 0,5 Unidades de MacFarland e confirmada a equivalência da absorvância desta em relação à solução-padrão, por análise espectrofotométrica, para a obtenção de uma concentração final de $(1-2) \times 10^6$ células mL^{-1} .

Distribuíram-se 990 μL do meio NYP inoculado pelos tubos de controlo positivo e pelos tubos contendo um volume de 10 μL das diluições dos óleos essenciais/constituintes maioritários, obtendo-se um intervalo de concentrações sub-inibitórias entre 0,02 e 10 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Incubaram-se os tubos de ensaio em estufa estática, durante 3 h a 37°C . A leitura dos resultados realizou-se pela contagem de 100 células por réplica em Câmara de Neubauer, separando o número de células filamentadas (apresentam tubo germinativo) e não filamentadas (não apresentam tubo germinativo). A percentagem de filamentação foi definida como o número de células cujo comprimento do tubo germinativo igualava ou excedia o diâmetro do blastosporo. Durante a contagem, excluíram-se as células que apresentavam gemulação, caracterizada por protuberâncias com constrição no ponto de ligação à célula-mãe.

Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão de três ensaios independentes, realizados em duplicado e repetidos sempre que se verificaram valores elevados de dispersão.

2.6.2. Efeito do óleo essencial na função mitocondrial de células de levedura (ensaio do MTT)

Testou-se o efeito das concentrações sub-inibitórias dos óleos essenciais na viabilidade celular de *Candida albicans* ATCC 10231 pelo ensaio de redução do sal tetrazólico MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio], baseado no método descrito por Pinto *et al.* (2013) com algumas modificações.

A suspensão inicial de células, ajustada a 0,5 Unidades de MacFarland, foi diluída em meio RPMI numa proporção de 1:1000, obtendo-se a densidade final de $0.5-2.5 \times 10^3$ C.F.U. mL^{-1} . Distribuiu-se 1 mL de meio RPMI inoculado pelos tubos de vidro estéreis de 12 x 55 mm, posteriormente incubados em estufa estática durante 18-24 horas a 37°C . Após o tempo de incubação, homogeneizaram-se as suspensões por agitação em vórtex, transferiram-se para tubos eppendorf estéreis e centrifugaram-se (Sigma 1-15 Microfuge) a 10,000 rpm durante 5 minutos. Após retirar o sobrenadante,

as células foram ressuspensas em 990 μL de meio RPMI, homogeneizadas e transferidas para os tubos de vidro, contendo 10 μL das diferentes diluições dos óleos essenciais, obtendo-se um intervalo de concentrações sub-inibitórias de teste entre 0,08 e 2,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Incluiu-se um tubo de controlo positivo contendo apenas a suspensão de células. Depois de 1 hora de incubação em estufa estática a 37°C, homogeneizaram-se as suspensões, transferiram-se para tubos eppendorf estéreis e recolheram-se as células por centrifugação a 10,000 rpm durante 5 minutos. Rejeitou-se o sobrenadante, ressuspenderam-se as células em 500 μl de meio RPMI e adicionou-se a todos os tubos 50 μl de MTT (preparado em meio RPMI 1640 a uma concentração de 5 mg mL^{-1}). No primeiro ensaio, incluíram-se, além do controlo positivo, dois tubos de controlo, um contendo 10 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de óleo essencial e outro 10 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de DMSO. Após 30 minutos de incubação em estufa estática a 37°C, recolheram-se por centrifugação a 10,000 rpm durante 5 minutos os cristais de *formazan*, resultantes da redução do MTT. Retirado o sobrenadante, dissolveram-se os cristais em 300 μl de DMSO, homogeneizou-se a solução e transferiu-se todo o volume para placas de micropoços. Mediu-se a absorvância num leitor automático de placas (SLT) a um comprimento de onda de 570 nm.

Os resultados são expressos em percentagem de redução de MTT relativamente ao controlo. Cada valor representa a média \pm SEM (erro padrão da média) de três ensaios independentes, realizados em duplicado. Para a análise estatística dos dados, realizou-se uma análise de variância de uma via (ANOVA) com pós-teste de Dunnett's, a fim de detetar a existência de diferenças significativas entre os tratamentos com diferentes concentrações de óleo essencial e o controlo de células mantidas em meio de cultura (níveis de significância: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). O software utilizado foi o GraphPad Prism versão 5.02.

3. Resultados

3.1. Atividade antifúngica

3.1.1. *Thymus albicans*

Apresentam-se na tabela II os resultados obtidos para a atividade antifúngica (MIC e MLC) do óleo essencial de *T. albicans* juntamente com os respetivos compostos

maioritários isolados (1,8-cineol, linalol, borneol e α -terpineol) contra todas as estirpes fúngicas testadas.

Quanto à atividade antifúngica do óleo essencial contra leveduras, o valor de MIC foi mais baixo para as estirpes de *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida guilliermondii* MAT23 e *Cryptococcus neoformans* CECT 1078 ($1,25 \mu\text{L mL}^{-1}$), sendo de $2,5 \mu\text{L mL}^{-1}$ para as restantes estirpes. Os valores de MLC igualaram os de MIC para todas as estirpes, à exceção da *C. albicans* ATCC 10231, para a qual o valor foi uma diluição superior ($2,5 \mu\text{L mL}^{-1}$). De um modo geral, o óleo essencial de *T. albicans* apresentou valores de MIC e MLC mais baixos contra os dermatófitos, com os valores a corresponder a $0,64 \mu\text{L mL}^{-1}$ para as estirpes *T. rubrum* CECT 2794 e *E. floccosum* FF9, e $1,25 \mu\text{L mL}^{-1}$ para as restantes. Para os *Aspergillus* spp., obtiveram-se os valores de MIC e MLC mais elevados, a variar entre 2,5 e $20 \mu\text{L mL}^{-1}$.

Entre todos os compostos maioritários testados, apenas o α -terpineol apresentou valores de MIC mais baixos ($1,25 \mu\text{L mL}^{-1}$) do que o óleo essencial ($2,5 \mu\text{L mL}^{-1}$) para três das estirpes de *Candida* spp. e para todas as estirpes de *Aspergillus* spp. ($0,32$ - $20 \mu\text{L mL}^{-1}$). Para os dermatófitos, os valores de MIC e MLC do óleo essencial foram menores do que os obtidos para todos os compostos isolados.

3.1.2. *Thymus lotocephalus*

Apresentam-se na tabela III os resultados obtidos para a atividade antifúngica (MIC e MLC) do óleo essencial de *T. lotocephalus* juntamente com os respetivos compostos maioritários isolados (linalol, 1,8-cineol e óxido de cariofileno) contra todas as estirpes fúngicas testadas.

No que respeita à atividade do óleo essencial contra *Candida* spp., obteve-se o valor de MIC e MLC mais baixo para a estirpe *C. guilliermondii* MAT23 ($0,64 \mu\text{L mL}^{-1}$ e $1,25 \mu\text{L mL}^{-1}$). Para as restantes, o valor de MIC foi igual ao de MLC ($2,5 \mu\text{L mL}^{-1}$), à exceção da *C. parapsilosis* ATCC 10231, para a qual o valor foi uma diluição superior ($5 \mu\text{L mL}^{-1}$). Entre todas as leveduras, o *Cryptococcus neoformans* CECT 1078 apresentou os menores valores de MIC ($0,32 \mu\text{L mL}^{-1}$) e MLC ($0,32$ - $0,64 \mu\text{L mL}^{-1}$). No que diz respeito aos dermatófitos, o óleo essencial de *T. lotocephalus* apresentou o intervalo de valores de MIC e MLC mais baixo ($0,16$ - $0,64 \mu\text{L mL}^{-1}$), com o valor de MLC a igualar o de MIC para todas as estirpes. Para os *Aspergillus* spp., o intervalo de

valores de MLC foi o mais elevado (5-20 $\mu\text{L mL}^{-1}$), não igualando o valor de MIC (1,25-2,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$) para nenhuma estirpe.

De um modo geral, o óleo essencial apresentou valores de MIC e MLC mais baixos do que os seus compostos maioritários para todas as estirpes testadas, igualando o óxido de cariofileno nos valores obtidos para o MIC e MLC de *C. neoformans* CECT 1078.

Comparando os compostos isolados entre si, para o linalol obtiveram-se menores valores de MIC e MLC para todas as estirpes de *Candida* spp. (5-10 $\mu\text{L mL}^{-1}$) e *Aspergillus* spp. (5-10 $\mu\text{L mL}^{-1}$). Para os dermatófitos, os valores de MIC e MLC deste composto situaram-se entre um intervalo de valores semelhante ao do óxido de cariofileno (1,25-2,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$).

Tabela II. Atividade antifúngica (MIC e MLC) do óleo essencial de *Thymus albianus* e dos seus compostos maioritários (1,8-cineol, linalol, borneol e α -terpineol) contra estirpes de *Candida*, *Cryptococcus neoformans*, dermatófitos e *Aspergillus*.

Estirpes	Thymus albianus		1,8-cineol		linalol		borneol		α -terpineol		Fluconazol		Anfoterici na B	
	MIC ^a	MLC ^a	MIC ^b	MLC ^b	MIC ^a	MLC ^a	MIC ^a	MLC ^a	MIC ^a	MLC ^a	MIC ^b	MLC ^b	MI	ML
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	1,25	2,5	10	10	5	5	2,5	>20	1,25	2,5	1	>128	N.T	N.T
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 13803	2,5	2,5	20	20	5	5	2,5	>20	1,25	2,5	4	>128	N.T	N.T
<i>Candida krusei</i> H9	2,5	2,5	10	10	10	10	5	>20	1,25	2,5	64	64-128	N.T	N.T
<i>Candida guilliermondii</i> MAT23	1,25	1,25	10	10	5	10	2,5	2,5	1,25	1,25-2,5	8	8	N.T	N.T
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 90018	2,5	2,5	10	10	10	10	5	>20	0,64-1,25	2,5	<1	<1	N.T	N.T
<i>Cryptococcus neoformans</i> CECT 1078	1,25	1,25	5-10	10	5	5	1,25	1,25	0,64-1,25	1,25	16	128	N.T	N.T
<i>Epidermophyton floccosum</i> FF9	0,64	0,64	5	5	1,25-2,5	2,5	2,5	2,5	1,25	1,25	16	16	N.T	N.T
<i>Microsporium canis</i> FF1	1,25	1,25	5	5	2,5	2,5	2,5	2,5	1,25	1,25	128	128	N.T	N.T
<i>Microsporium gypseum</i> CECT 2908	1,25	1,25	5-10	10	1,25-2,5	2,5	2,5	2,5	1,25	1,25	128	>128	N.T	N.T
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> FF7	1,25	1,25	5	5	1,25	2,5	2,5	5	1,25	2,5	16-32	32-64	N.T	N.T
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> var. interdigitale CECT 2958	1,25	1,25	10	10	2,5	2,5-5	2,5	5	-	-	128	\geq 128	N.T	N.T
<i>Trichopyton rubrum</i> CECT 2794	0,64	0,64	2,5-5	5	1,25	1,25-2,5	2,5	2,5	1,25	1,25-2,5	16	64	N.T	N.T
<i>Trichophyton verrucosum</i> CECT 2992	1,25	1,25	10	10-20	1,25-2,5	1,25-2,5	2,5	2,5	-	-	>128	>128	N.T	N.T
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	2,5	10-20	10	>20	5	\geq 20	5	>20	0,64	10-20	N.T	N.T	1-2	4
<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 46645	2,5	5	10	10-20	2,5	20	2,5	>20	0,32-0,64	2,5	N.T	N.T	2	4
<i>Aspergillus flavus</i> F44	5	5-10	20	20	10	\geq 20	5	>20	0,64-1,25	2,5	N.T	N.T	2	8

^a MIC e MLC determinadas pelo método de macrodiluição e expressas em $\mu\text{L mL}^{-1}$ (v/v).

^b MIC e MLC determinadas pelo método de macrodiluição e expressas em $\mu\text{g mL}^{-1}$ (p/v).

N.T – Não testado.

Tabela III. Atividade antifúngica (MIC e MLC) do óleo essencial de *Thymus lotocephalus* e dos seus compostos maioritários (linalol, 1,8-cineol e óxido de cariofileno) contra estirpes de *Candida*, *Cryptococcus neoformans*, dermatófitos e *Aspergillus*.

Estirpes	<i>Thymus lotocephalus</i>											
	linalol		1,8-cineol		óxido de cariofileno		Fluconazol		Anfotericina B			
	MIC ^a	MLC ^a	MIC ^a	MLC ^b	MIC ^a	MLC ^a	MIC ^a	MLC ^b	MIC ^b	MLC ^b	MIC ^b	N.T
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	2,5	2,5	5	5	10	10	>20	>20	1	>128	N.T	N.T
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 13803	2,5	2,5	5	5	20	20	>20	>20	4	>128	N.T	N.T
<i>Candida krusei</i> H9	2,5	2,5	10	10	10	10	>20	>20	64	64-128	N.T	N.T
<i>Candida guilliermondii</i> MAT23	0,64	1,25	5	10	10	10	>20	>20	8	8	N.T	N.T
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 90018	2,5	5	10	10	10	10	>20	>20	<1	<1	N.T	N.T
<i>Cryptococcus neoformans</i> CECT 1078	0,32	0,32-0,64	5	5	5-10	10	0,32	0,32-0,64	16	128	N.T	N.T
<i>Epidermophyton floccosum</i> FF9	0,16	0,16	1,25-2,5	2,5	5	5	1,25	1,25	16	16	N.T	N.T
<i>Microsporium canis</i> FF1	0,32-0,64	0,32-0,64	2,5	2,5	5	5	1,25	1,25-2,5	128	128	N.T	N.T
<i>Microsporium gypseum</i> CECT 2908	0,64	0,64	1,25-2,5	2,5	5-10	10	1,25	2,5-5	128	>128	N.T	N.T
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> FF7	0,64	0,64	1,25	2,5	5	5	1,25	1,25-2,5	16-32	32-64	N.T	N.T
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i> CECT 2958	0,64	0,64	2,5	2,5-5	10	10	2,5	5-10	128	≥128	N.T	N.T
<i>Trichopyton rubrum</i> CECT 2794	0,16	0,16	1,25	1,25-2,5	2,5-5	5	1,25	1,25	16	64	N.T	N.T
<i>Trichophyton verrucosum</i> CECT 2992	0,64	0,64	1,25-2,5	1,25-2,5	10	10-20	2,5	>20	>128	>128	N.T	N.T
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	1,25	20	5	≥20	10	>20	>20	>20	N.T	N.T	1-2	4
<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 46645	2,5	5-10	2,5	20	10	10-20	>20	>20	N.T	N.T	2	4
<i>Aspergillus flavus</i> F44	2,5	10-20	10	≥20	20	20	>20	>20	N.T	N.T	2	8

^a MIC e MLC determinadas pelo método de macrodiluição e expressas em $\mu\text{L mL}^{-1}$ (v/v).

^b MIC e MLC determinadas pelo método de macrodiluição e expressas em $\mu\text{g mL}^{-1}$ (p/v).

N.T – Não testado.

3.2. Inibição do tubo germinativo

Os resultados da percentagem de filamentação de *Candida albicans* ATCC 10231 quando exposta a diferentes concentrações (de MIC a MIC/64) de óleo essencial de *T. albicans* e *T. lotocephalus* e de compostos maioritários isolados são apresentados na tabela IV e V, respetivamente.

3.2.1. *Thymus albicans*

O óleo essencial inibiu totalmente a formação do tubo germinativo na concentração sub-inibitória de $0,64 \mu\text{L mL}^{-1}$ (MIC/2), tendo ocorrido uma percentagem mínima de filamentação ($3,3 \pm 1,3\%$) na concentração de $0,32 \mu\text{L mL}^{-1}$ (MIC/4) e cerca de 70% de inibição da filamentação na concentração de $0,16 \mu\text{L mL}^{-1}$.

Para o linalol a inibição total da filamentação ocorreu à mesma concentração que se verificou para o óleo essencial ($0,64 \mu\text{L mL}^{-1}$). Os restantes compostos maioritários inibiram completamente a formação de tubo germinativo no valor de MIC, num intervalo de concentrações entre $1,25$ e $10 \mu\text{L mL}^{-1}$, correspondendo a concentração mais elevada ao 1,8-cineol e a mais baixa ao α -terpineol.

3.2.2. *Thymus lotocephalus*

O óleo essencial inibiu totalmente a formação do tubo germinativo na concentração de $0,32 \mu\text{L mL}^{-1}$ (MIC/8), tendo ocorrido uma percentagem mínima de filamentação ($4,1 \pm 1,8\%$) na concentração de $0,16 \mu\text{L mL}^{-1}$.

Os compostos maioritários testados, linalol e 1,8-cineol, inibiram a filamentação a concentrações superiores, de $0,64$ e $10 \mu\text{L mL}^{-1}$, respetivamente.

Tabela IV. Percentagem de filamentação de *Candida albicans* ATCC 10231 com as concentrações sub-inibitórias do óleo essencial de *Thymus albicans* e seus compostos maioritários (1,8-cineol, linalol, borneol e α -terpineol).

	<i>Thymus albicans</i>	1,8-cineol	linalol	borneol	α -terpineol
Controlo^a	87,4 ± 1,1	87,0 ± 3,7	82,8 ± 0,6	83,1 ± 0,3	81,8 ± 1,5
0,02^b	71,8 ± 4,5				
0,04	63,1 ± 8,7			77,5 ± 2,8	71,7 ± 2,1
0,08	51,9 ± 8,0		69,0 ± 2,5	74,3 ± 2,3	62,8 ± 5,8
0,16	32,8 ± 7,3		39,2 ± 0,6	63,8 ± 4,0	49,8 ± 9,6
0,32	3,3 ± 1,3	69,2 ± 4,9	11,7 ± 4,2	49,0 ± 4,9	17,5 ± 5,7
0,64	0,0 ± 0,0	56,7 ± 5,2	0,0 ± 0,0	24,8 ± 3,5	0,2 ± 0,2
1,25	0,0 ± 0,0	28,2 ± 7,0	0,0 ± 0,0	3,8 ± 0,8	0,0 ± 0,0
2,5		2,5 ± 1,8	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	
5		0,2 ± 0,2	0,0 ± 0,0		
10		0,0 ± 0,0			

^a Amostras sem óleo essencial, apenas com 1% de DMSO.

^b Concentração absoluta de óleo essencial em $\mu\text{L mL}^{-1}$.

Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão de três ensaios realizados em separado.

Tabela V. Percentagem de filamentação de *Candida albicans* ATCC 10231 com as concentrações sub-inibitórias do óleo essencial de *Thymus lotocephalus* e seus compostos maioritários (linalol e 1,8-cineol).

	<i>Thymus lotocephalus</i>	linalol	1,8-cineol
Controlo^a	89,8 ± 0,8	82,8 ± 0,6	87,0 ± 3,7
0,02^b	67,8 ± 7,0		
0,04	53,7 ± 4,9		
0,08	37,3 ± 2,2	69,0 ± 2,5	
0,16	4,1 ± 1,8	39,2 ± 0,6	
0,32	0,0 ± 0,0	11,7 ± 4,2	69,2 ± 4,9
0,64	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	56,7 ± 5,2
1,25	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	28,2 ± 7,0
2,5		0,0 ± 0,0	2,5 ± 1,8
5		0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,2
10		0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

^a Amostras sem óleo essencial, apenas com 1% de DMSO.

^b Concentração absoluta de óleo essencial em $\mu\text{L mL}^{-1}$.

Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão de três ensaios realizados em separado.

3.3. Efeito do óleo essencial na função mitocondrial de células de levedura (ensaio do MTT)

A influência de concentrações sub-inibitórias (MIC a MIC/64) dos óleos essenciais de *T. albicans* e *T. lotocephalus* na atividade mitocondrial de *Candida albicans* ATCC 10231 é apresentada na figura 6.

Os dois óleos essenciais comprometeram a função mitocondrial da levedura de uma forma dose-dependente.

O óleo essencial de *T. albicans* reduziu significativamente a atividade mitocondrial, em relação ao controlo, nas concentrações sub-inibitórias de 0,64 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (MIC/2) e 0,32 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (MIC/4), tendo sido aproximadamente 50% na concentração 0,32 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (Fig. 6a).

Para todas as concentrações testadas de óleo essencial de *T. lotocephalus* observou-se redução significativa da atividade mitocondrial, sendo inferior a 50% apenas na concentração de 2,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (MIC) (Fig. 6b).

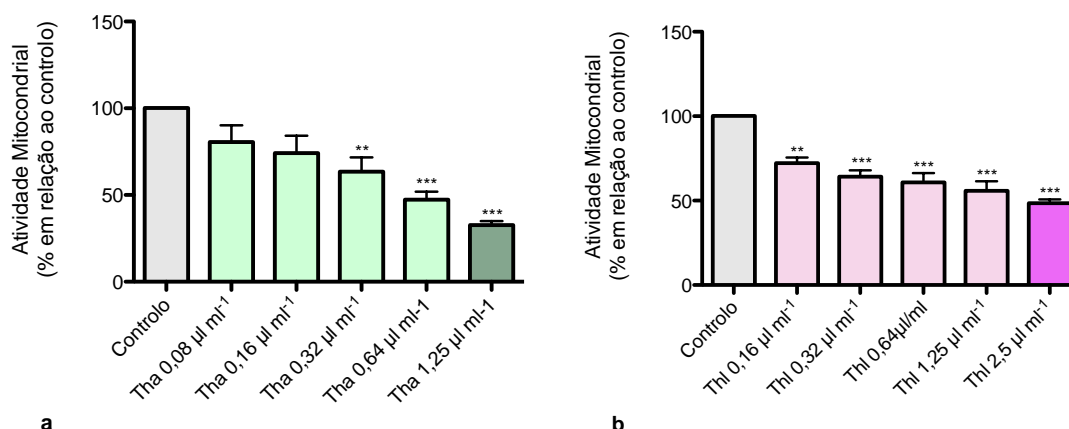


Figura 6. Atividade mitocondrial de células de *Candida albicans* ATCC 10231 tratadas com diferentes concentrações de óleo essencial de *Thymus albicans* (a) e *Thymus lotocephalus* (b). Os resultados são expressos como percentagem de redução de MTT em relação ao controlo (células mantidas em meio de cultura). Cada valor representa a média \pm SEM de três ensaios independentes, realizados em duplicado (**p < 0.01, ***p < 0.001, comparativamente ao controlo). As barras destacadas a verde e rosa escuro indicam as concentrações de MIC.

4. Discussão

Os óleos essenciais em estudo demonstraram ter uma atividade antifúngica de largo espectro, com eficácia contra todas as estirpes de *Candida*, *Cryptococcus neoformans*, dermatófitos e *Aspergillus* testadas.

De um modo geral, as estirpes de dermatófitos mostraram maior susceptibilidade, com valores de MIC e MLC a variar entre 0,64-1,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$ e 0,16-1,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$) para os óleos essenciais de *Thymus albicans* e *T. lotocephalus*, respetivamente. Para as leveduras, apresentaram uma atividade relativamente mais fraca, com valores de MIC e MLC desde 0,32 a 5 $\mu\text{L mL}^{-1}$, tendo o óleo de *T. lotocephalus* sido o mais ativo contra *Cryptococcus neoformans* CECT 1078, e o de *T. albicans* contra *Candida albicans* ATCC 10231. As estirpes de *Aspergillus* spp. revelaram ser as menos susceptíveis a ambos os óleos (valores de MIC e MLC desde 1,25 a 20 $\mu\text{L mL}^{-1}$), sendo esta tendência partilhada por óleos essenciais de tomilhos não-fenólicos, como o *Thymus capitellatus* (Salgueiro *et al.*, 2006), *Thymus camphoratus* e *Thymus carnosus* (Alves, 2013), e de outros géneros (*Juniperus*, *Lavandula* e *Distichoselinum*) testados pelo método de referência do CLSI (Cavaleiro *et al.*, 2006; Tavares *et al.*, 2010; Zuzarte *et al.*, 2011a).

Quanto ao óleo essencial de *T. albicans*, rico maioritariamente em 1,8-cineol e linalol, o facto dos valores de MIC e MLC serem equivalentes para totalidade das estirpes de dermatófitos, *Candida* spp. (exceptuando-se apenas *Candida albicans* ATCC 10231) e *Cryptococcus neoformans*, revela uma clara atividade fungicida. A atividade antifúngica dos seus compostos maioritários foi analisada separadamente, sendo notório que todos os compostos partilham maior atividade contra os dermatófitos, sendo α -terpineol o mais ativo. O óleo essencial demonstra melhor atividade antifúngica do que os seus compostos maioritários isolados contra a grande maioria das estirpes testadas, com apenas três das estirpes de *Candida* spp. e as de *Aspergillus* spp. mais susceptíveis ao α -terpineol.

Embora o óleo essencial de *T. albicans* tenha apresentado uma modesta atividade contra *Candida* spp., revela-se mais efetivo do que o óleo essencial *T. mastichina* subsp. *mastichina*, também cineólico, testado para as mesmas estirpes por Pina-Vaz *et al.* (2004). Considera-se relevante ressaltar esta diferença pelo facto do *T. mastichina*, pertencente à mesma secção botânica, estar entre as espécies de tomilhos com maior relevância económica, essencialmente devido ao seu óleo essencial.

Com elevado teor em linalol, 1,8-cineol e óxido de cariofileno, o óleo essencial de *T. lotocephalus*, também revelou atividade fungicida. A atividade antifúngica dos seus compostos maioritários foi analisada separadamente, revelando que o 1,8-cineol é o composto com menor atividade contra todas as estirpes. O linalol é o composto mais ativo contra as estirpes de *Candida* spp.. O óxido de cariofileno não revelou atividade para *Candida* spp., no entanto, é o composto mais ativo contra as estirpes de *Cryptococcus neoformans*, dermatófitos e *Aspergillus* spp.. À exceção do *C. neoformans*, todas as estirpes testadas demonstram maior susceptibilidade ao óleo essencial.

Dado que os óleos essenciais se tratam de misturas complexas, constituídas por um grande número de compostos que podem interagir entre si, torna-se difícil a atribuição da sua atividade a um composto específico. Não obstante, os compostos presentes em maior concentração são, muitas vezes, responsáveis pela atividade biológica do óleo no seu todo (Proença da Cunha *et al*, 2010). No presente estudo, a atividade do óleo essencial de *T. albicans* contra *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans* e dermatófitos parece dever-se em parte ao seu teor em α -terpineol, embora este não corresponda ao composto presente em maior concentração. O facto do óleo revelar maior atividade do que os seus compostos maioritários e, por outro lado, uma fraca atividade contra as estirpes *Aspergillus* spp., sugere a existência de interações (de sinergia e antagonismo) entre os diferentes componentes e a influência de compostos presentes em concentrações reduzidas (Koroch *et al*, 2007; Bassolé & Juliani, 2012). Veja-se a comprovada atividade sinérgica entre compostos maioritários de óleos essenciais de tomilhos (timol/1,8-cineol e timol/ p -cimeno) reportada por Pina-Vaz *et al*. (2004).

Também para o óleo de *T. lotocephalus* a interação sinérgica dos seus constituintes e a existência de compostos minoritários com marcada atividade antifúngica, são hipóteses prováveis para justificar o facto da sua atividade antifúngica ser superior à dos seus compostos maioritários. O óxido de cariofileno configura-se como um composto com influência na atividade anti-dermatofítica do óleo essencial. A reforçar esta hipótese, um estudo levado a cabo por Cavaleiro *et al*. (2011) contra as mesmas estirpes de dermatófitos, segundo o mesmo método, demonstrou atividade semelhante do óleo essencial de *Eryngium duriaei* subsp. *juresianum* com teor similar em óxido de cariofileno, atribuindo-lhe a atividade.

A complexidade dos óleos essenciais é também um fator determinante no seu, ainda pouco esclarecido, mecanismo de ação. Com o intuito de confirmar o potencial dos óleos essenciais em estudo no tratamento da candidíase, realizaram-se ensaios de mecanismo de ação em *Candida albicans*, seu principal agente etiológico, avaliando-se a percentagem de inibição da formação do tubo germinativo, um importante fator de virulência, e de redução de MTT na presença de diferentes concentrações de óleo, partindo do já determinado valor de MIC até MIC/64.

Partindo do pressuposto que as desidrogenases mitocondriais das células metabolicamente ativas são responsáveis pela redução do MTT (sal tetrazólico de cor amarela) em cristais insolúveis de *formazan* (de cor arroxeadada), da quantificação por espectrofotometria desse produto pode inferir-se a atividade mitocondrial. Assim sendo, através do ensaio do MTT foi possível concluir o envolvimento dos óleos essenciais em estudo na inibição de enzimas mitocondriais de leveduras, com o comprometimento da atividade mitocondrial e conseqüente morte celular a ocorrer de uma forma dose-dependente, após 1 hora de exposição ao óleo essencial. O estudo no qual se fundamenta o método seguido apresenta resultados concordantes, para o óleo essencial de *Thymus villosus* subsp. *lusitanicus* (Pinto *et al.*, 2013). A disfunção mitocondrial em células de levedura expostas a óleos essenciais é também referida por Bakkali *et al.* (2005). Esse mesmo estudo indica que, devido a esse mecanismo de ação, os óleos essenciais promovem a morte de leveduras por apoptose, evitando a ocorrência de eventos nucleares mutagênicos ou recombinogênicos nas leveduras após o tratamento, o que sugere a ausência de riscos de genotoxicidade para humanos na terapia antifúngica usando óleos essenciais.

Quanto à inibição do tubo germinativo, o óleo essencial de *T. lotocephalus* inibiu totalmente a sua formação a uma concentração oito vezes menor do que o seu MIC (0,32 $\mu\text{L mL}^{-1}$). A inibição total por parte do *T. albicans* ocorreu a uma concentração superior (0,64 $\mu\text{L mL}^{-1}$ correspondente a MIC/2), no entanto, a 0,16 $\mu\text{L mL}^{-1}$ a inibição da filamentação foi de 70%. O facto de nenhum dos compostos maioritários isolados ter apresentado maior atividade do que o óleo essencial no seu todo, evidencia a existência de interações sinérgicas entre eles, tal como sugerido por Pinto *et al.* (2013) para o óleo essencial de *Thymus villosus* subsp. *lusitanicus*.

O linalol foi o único composto maioritário capaz de inibir a filamentação a concentrações sub-inibitórias, com mais de 50% de inibição até à concentração de 0,16 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (MIC/64), no entanto, a inibição total ocorreu à mesma concentração que se

verificou em *T. albicans*. A interferência do linalol no dimorfismo de *Candida albicans* é também demonstrada por outros estudos (D'Auria *et al.*, 2005; Hsu *et al.*, 2013). Os resultados que se apresentam para o 1,8-cineol são similares aos reportados por Pina-Vaz *et al.* (2004), estudo a partir do qual se pode depreender que os óleos essenciais em estudo se revelam mais efetivos na inibição da formação do tubo germinativo do que alguns tomilhos fenólicos, como o *Thymus vulgaris* e *Thymus zygis* que apresentam valores de MIC marcadamente mais baixos (0,16-0,32 $\mu\text{L mL}^{-1}$).

Tendo sido sugerido que a inibição da formação do tubo germinativo é, por si só, suficiente para tratar a candidíase invasiva em modelos animais (Zuzarte, 2013), os óleos essenciais de *T. albicans* e *T. lotocephalus* configuram-se como alternativas terapêuticas viáveis, direcionados para fatores de virulência e alvos celulares distintos dos explorados pelos antifúngicos convencionais. Nos capítulos subsequentes apresentam-se os resultados de um estudo preliminar da toxicidade destes óleos, por avaliação do seu efeito na viabilidade celular de macrófagos, queratinócitos e hepatócitos, usando modelos *in vitro*.

5. Bibliografia

- Abu-Elteen, K. H. & Hamad, M. (2005) Antifungal Agents for use in Human Therapy. In: K. Kavanagh (Ed.) *Fungi: Biology and Applications* (191-217). Wiley.
- Alcazar-Fuoli, L., & Mellado, E. (2014). Current status of antifungal resistance and its impact on clinical practice. *British Journal of Haematology*.
- Alves, M. P. (2013). Avaliação das potencialidades medicinais de *Thymus camphoratus* Hoffmanns. & Link. e *Thymus carnosus* Boiss. Dissertação de Mestrado. Universidade de Coimbra. Coimbra, Portugal.
- Amber, K., Aijaz, A., Immaculata, X., Luqman, K. A., & Nikhat, M. (2010). Anticandidal effect of *Ocimum sanctum* essential oil and its synergy with fluconazole and ketoconazole. *Phytomedicine*, 17(12), 921-925.
- Ameen, M. (2010). Epidemiology of superficial fungal infections. *Clinics in Dermatology*, 28(2), 197-201.
- Arthington-Skaggs, B. A. & Rex, J. H. (2008). In: I. W. Fong & K. Drlica (Eds.) *Antimicrobial Resistance and Implications for the Twenty-First Century* (325-369). Springer.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Zhiri, A., & Idaomar, M. (2005). Cytotoxicity and gene induction by some essential oils in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 585(1), 1-13.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446-475.
- Bassolé, I. H. N., & Juliani, H. R. (2012). Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*, 17(4), 3989-4006.

- Binder, U., & Lass-Flörl, C. (2011). Epidemiology of invasive fungal infections in the mediterranean area. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 3(1), e2011016.
- Bratton, E. W., El Hussein, N., Chastain, C. A., Lee, M. S., Poole, C., Stürmer, T. *et al.* (2012). Comparison and temporal trends of three groups with cryptococcosis: HIV-infected, solid organ transplant, and HIV-negative/non-transplant. *PloS one*, 7(8), e43582.
- Cavaleiro, C., Pinto, E., Gonçalves, M. J., & Salgueiro, L. (2006). Antifungal activity of *Juniperus* essential oils against dermatophyte, *Aspergillus* and *Candida* strains. *Journal of Applied Microbiology*, 100(6), 1333-1338.
- Cavaleiro, C., Gonçalves, M. J., Serra, D., Santoro, G., Tomi, F., Bighelli, A., ... & Casanova, J. (2011). Composition of a volatile extract of *Eryngium duriaei* subsp. *juresianum* (M. Laínz) M. Laínz, signalled by the antifungal activity. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 54(3), 619-622.
- CLSI (2008a). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard, 3rd edn. M27- A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- CLSI (2008b). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard, 3rd edn. M38-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Costa-de-Oliveira, S., Pina-Vaz, C., Mendonça, D., & Rodrigues, A. G. (2008). A first Portuguese epidemiological survey of fungaemia in a university hospital. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 27(5), 365-374.
- Council of Europe. 2010. European Pharmacopoeia, 7th ed. Council of Europe, Strasbourg.

- D'Auria, F. D., Tecca, M., Strippoli, V., Salvatore, G., Battinelli, L., & Mazzanti, G. (2005). Antifungal activity of *Lavandula angustifolia* essential oil against *Candida albicans* yeast and mycelial form. *Medical Mycology*, 43(5), 391-396.
- Deacon, J. (2006a) Introduction: the fungi and fungal activities. In: *Fungal Biology* (1-14). Blackwell Publishing.
- Deacon, J. (2006b). The moulds of man. In: *Fungal Biology* (322-337). Blackwell Publishing.
- Del Poeta, M., & Casadevall, A. (2012). Ten challenges on *Cryptococcus* and cryptococcosis. *Mycopathologia*, 173(5-6), 303-310.
- Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., Pedro, L. G., Salgueiro, L., Miguel, M. G., & Faleiro, M. L. (2008). Portuguese *Thymbra* and *Thymus* species volatiles: chemical composition and biological activities. *Current Pharmaceutical Design*, 14(29), 3120-3140.
- Gauwerky, K., Borelli, C., & Korting, H. C. (2009). Targeting virulence: a new paradigm for antifungals. *Drug Discovery Today*, 14(3), 214-222.
- Gonçalves, M. J., Cruz, M. T., Cavaleiro, C., Lopes, M. C., & Salgueiro, L. (2010). Chemical, antifungal and cytotoxic evaluation of the essential oil of *Thymus zygis* subsp. *sylvestris*. *Industrial Crops and Products*, 32(1), 70-75.
- Graybill, J. R., Anstead, G. M., Queiroz-Telles, F. (2007). The Diagnosis of Endemic Mycoses. In: J. A. Maertens & K. A. Marr (Eds.) *The Diagnosis of Fungal Mycosis* (291-354). Informa Healthcare USA.
- Gupta, A. K., & Cooper, E. A. (2008). Update in antifungal therapy of dermatophytosis. *Mycopathologia*, 166(5-6), 353-367.

- Hadrich, I., Makni, F., Neji, S., Abbes, S., Cheikhrouhou, F., Trabelsi, H. *et al.* (2012). Invasive aspergillosis: resistance to antifungal drugs. *Mycopathologia*, *174*(2), 131-141.
- Havlickova, B., Czaika, V. A., & Friedrich, M. (2008). Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses*, *51*(s4), 2-15.
- Hsu, C. C., Lai, W. L., Chuang, K. C., Lee, M. H., & Tsai, Y. C. (2013). The inhibitory activity of linalool against the filamentous growth and biofilm formation in *Candida albicans*. *Medical Mycology*, *51*(5), 473-482.
- Hube, B. (2009) Fungal adaptation to the host environment. *Current Opinion in Microbiology*, *12*, 347-349.
- Jayatilake, J. A. M. S., Tilakaratne, W. M., & Panagoda, G. J. (2009). Candidal onychomycosis: a mini-review. *Mycopathologia*, *168*(4), 165-173.
- Khan, M. S. A., & Ahmad, I. (2011). Antifungal activity of essential oils and their synergy with fluconazole against drug-resistant strains of *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *90*(3), 1083-1094.
- Koroch, A. R., Juliani, H. R., & Zygodlo, J. A. (2007). Bioactivity of essential oils and their components. In *Flavours and fragrances* (pp. 87-115). Springer Berlin Heidelberg.
- Lass-Flörl, C. (2009). The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. *Mycoses*, *52*(3), 197-205.
- Lewis, R. E., Cahyame-Zuniga, L., Leventakos, K., Chamilos, G., Ben-Ami, R., Tamboli, P. *et al.* (2013). Epidemiology and sites of involvement of invasive fungal infections in patients with haematological malignancies: a 20-year autopsy study. *Mycoses*, *56*(6), 638-645.

- Liao, Y., Chen, M., Hartmann, T., Yang, R. Y., & Liao, W. Q. (2013). Epidemiology of opportunistic invasive fungal infections in China: review of literature. *Chinese Medical Journal (Engl)*, 126(2), 361-368.
- Marichal, P., Gorrens, J., Cutsem, J., & Bossche, H. V. (1986). Culture Media for the Study of the Effects of Azole Derivatives on Germ Tube Formation and Hyphal Growth of *C. albicans*. *Mycoses*, 29(2), 76-81.
- Martínez-Martínez, M. U., Herrera-van Oostdam, D., Román-Acosta, S., Magaña-Aquino, M., Baranda-Cándido, L., & Abud-Mendoza, C. (2012). Invasive fungal infections in patients with systemic lupus erythematosus. *The Journal of Rheumatology*, 39(9), 1814-1818.
- Miceli, M. H., Díaz, J. A., & Lee, S. A. (2011). Emerging opportunistic yeast infections. *The Lancet infectious diseases*, 11(2), 142-151.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65: 55–63.
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., Pfaller, M. A. (2013a). Pathogenesis of Fungal Disease. In: *Medical Microbiology* (611-618). Elsevier SAUNDERS.
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., Pfaller, M. A. (2013b). Antifungal Agents. In: *Medical Microbiology* (631-642). Elsevier SAUNDERS.
- Neofytos, D., Fishman, J. A., Horn, D., Anaissie, E., Chang, C. H., Olyaei, A., Pfaller, M., Steinbach, W. J., Webster, K. M., Marr, K. A. (2010). Epidemiology and outcome of invasive fungal infections in solid organ transplant recipients. *Transplant Infectious Disease*, 12(3), 220-229.
- Nguefack, J., Leth, V., Amvam Zollo, P. H., & Mathur, S. B. (2004). Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and

mycotoxin producing fungi. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 329-334.

Palmeira-de-Oliveira, A., Salgueiro, L., Palmeira-de-Oliveira, R., Martinez-de-Oliveira, J., Pina-Vaz, C., Queiroz, J. A., & Rodrigues, A. G. (2009). Anti-*Candida* activity of essential oils. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 9(11), 1292-1305.

Palmeira-de-Oliveira, A., Palmeira-de-Oliveira, R., Gaspar, C., Salgueiro, L., Cavaleiro, C., Martinez-de-Oliveira, J. *et al.* (2013). Association of *Thymbra capitata* essential oil and chitosan (TCCH hydrogel): a putative therapeutic tool for the treatment of vulvovaginal candidosis. *Flavour and Fragrance Journal*, 28(6), 354-359.

Pfaller, M. A., & Diekema, D. J. (2010). Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Critical Reviews in Microbiology*, 36(1), 1-53.

Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Gibbs, D. L., Newell, V. A., Bijie, H., Dzierzanowska, D., ... & Zaidi, M. (2009). Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: 10.5-year analysis of susceptibilities of noncandidal yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(1), 117-123.

Pfaller, M. A., Pappas, P. G., & Wingard, J. R. (2006). Invasive fungal pathogens: current epidemiological trends. *Clinical Infectious Diseases*, 43(Supplement 1), S3-S14.

Pfaller, M., Boyken, L., Hollis, R., Kroeger, J., Messer, S., Tendolkar, S., & Diekema, D. (2011). Use of epidemiological cutoff values to examine 9-year trends in susceptibility of *Aspergillus* species to the triazoles. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(2), 586-590.

- Pina-Vaz, C., Gonçalves Rodrigues, A., Pinto, E., Costa-de-Oliveira, S., Tavares, C., Salgueiro, L., Cavaleiro, C., Gonçalves, M.J., Martinez-de-Oliveira, J. (2004). Antifungal activity of *Thymus* oils and their major compounds. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 18(1), 73-78.
- Pinto, E., Pina-Vaz, C., Salgueiro, L., Gonçalves, M. J., Costa-de-Oliveira, S., Cavaleiro, C., Palmeira, A., Rodrigues, A., Martinez-de-Oliveira, J. (2006). Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *Journal of Medical Microbiology*, 55(10), 1367-1373.
- Pinto, E., Vale-Silva, L., Cavaleiro, C., & Salgueiro, L. (2009). Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *Journal of Medical Microbiology*, 58(11), 1454-1462.
- Pinto, E., Goncalves, M. J., Hrimpeng, K., Pinto, J., Vaz, S., Vale-Silva, L. A., Cavaleiro, C., Salgueiro, L. (2013). Antifungal activity of the essential oil of *Thymus villosus* subsp. *lusitanicus* against *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *Industrial Crops and Products*, 51, 93-99.
- Proença da Cunha, A. & Roque, O. (2010). A Farmacognosia nos Estudos Farmacêuticos cap. 1 pp. 4-15. In: Proença da Cunha, A. (coord.) Farmacognosia e Fitoquímica. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.
- Rautemaa, R., & Ramage, G. (2011). Oral candidosis-clinical challenges of a biofilm disease. *Critical Reviews in Microbiology*, 37(4), 328-336.
- Ruhnke, M., Hartwig, K., & Kofla, G. (2008). New options for treatment of candidaemia in critically ill patients. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(s4), 46-54.

- Salgueiro, L. R., Pinto, E., Gonçalves, M. J., Costa, I., Palmeira, A., Cavaleiro, C. *et al.* (2006). Antifungal activity of the essential oil of *Thymus capitellatus* against *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte strains. *Flavour and Fragrance Journal*, 21(5), 749-753.
- Seebacher, C., Bouchara, J. P., & Mignon, B. (2008). Updates on the epidemiology of dermatophyte infections. *Mycopathologia*, 166(5-6), 335-352.
- Sifuentes-Osornio, J., Corzo-León, D. E., & Ponce-de-León, L. A. (2012). Epidemiology of invasive fungal infections in Latin America. *Current Fungal Infection Reports*, 6(1), 23-34.
- Silva, F., Ferreira, S., Duarte, A., Mendonça, D. I., & Domingues, F. C. (2011). Antifungal activity of *Coriandrum sativum* essential oil, its mode of action against *Candida* species and potential synergism with amphotericin B. *Phytomedicine*, 19(1), 42-47.
- Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D. W., & Azeredo, J. (2012). *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(2), 288-305.
- Sloan, D. J., & Parris, V. (2014). Cryptococcal meningitis: epidemiology and therapeutic options. *Clinical epidemiology*, 6, 169.
- Soković, M. D., Vukojević, J., Marin, P. D., Brkić, D. D., Vajs, V., & Van Griensven, L. J. (2009). Chemical Composition of Essential Oils of *Thymus* and *Mentha* Species and Their Antifungal Activities. *Molecules*, 14(1), 238-249.
- Srinivasan, A., Lopez-Ribot, J. L., & Ramasubramanian, A. K. (2014). Overcoming antifungal resistance. *Drug Discovery Today: Technologies*, 11, 65-71.
- Steinbach, W. J. (2010). Epidemiology of invasive fungal infections in neonates and children. *Clinical Microbiology and Infection*, 16(9), 1321-1327.

- Sullivan, D., Moran, G., Coleman, D. (2005). Fungal Diseases of Humans. In: K. Kavanagh (Ed.) *Fungi: Biology and Applications* (191-217). Wiley.
- Tabassum, N., & Vidyasagar, G. M. (2013). Antifungal investigations in plant essential oils: A review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5, 19-28.
- Tavares, A. C., Gonçalves, M. J., Cruz, M. T., Cavaleiro, C., Lopes, M. C., Canhoto, J., & Salgueiro, L. R. (2010). Essential oils from *Distichoselinum tenuifolium*: Chemical composition, cytotoxicity, antifungal and anti-inflammatory properties. *Journal of Ethnopharmacology*, 130(3), 593-598.
- Tran-Dinh, N. (2013). Mycotoxins and food. *Microbiology Australia*, 34(2), 70-72.
- van Burik, J. A. H., & Magee, P. T. (2001). Aspects of fungal pathogenesis in humans. *Annual Reviews in Microbiology*, 55(1), 743-772.
- Venturini, J., Alvares, A. M., Camargo, M. R. D., Marchetti, C. M., Fraga-Silva, T. F. D. C., Luchini, A. C., & Arruda, M. S. P. D. (2012). Dermatophyte–host relationship of a murine model of experimental invasive dermatophytosis. *Microbes and Infection*, 14(13), 1144-1151.
- Wachtel-Galor, S. & Benzie, I. F. F. (2011) Herbal Medicine: An Introduction to its History, Usage, Regulation, Current Trends, and Research Needs. In: Wachtel-Galor, S. & Benzie, I. F. F. (eds.) *Herbal Medicine: Biomolecular and clinical aspects* (1-10). CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Weitzman, I., & Summerbell, R. C. (1995). The dermatophytes. *Clinical Microbiology Reviews*, 8 (2), 240-259.

Zuzarte, M., Gonçalves, M. J., Cavaleiro, C., Canhoto, J., Vale-Silva, L., Silva, M. J., Pinto, E., Salgueiro, L. (2011a). Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Lavandula viridis* L'Hér. *Journal of medical microbiology*,60(5), 612-618.

Zuzarte, M., Gonçalves, M. J., Canhoto, J., & Salgueiro, L. (2011b) Antidermatophytic activity of essential oils. In: A. Méndez-Vilas (ed.) *Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances* (1167-1178). *Microbiology Book Series, n°3, 2*.

Zuzarte, M. R. (2013) Portuguese lavenders: evaluation of their potential use for health and agricultural purposes. Tese de doutoramento. Universidade de Coimbra. Coimbra, Portugal.

Zuzarte, M., Martins, A. P., Gonçalves, M. J., Salgueiro, L. R. (2014) Mycotoxins Contamination in Food: Alternative Plant Preservatives, Legislation, and Detection Methods. In: K. Hostettmann (Ed.) *Chemical and Biological Plant Analytical Methods. Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, Ltd.

III. ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

1. Introdução

A inflamação aguda é uma reação natural do organismo humano iniciado como resposta a estímulos nocivos, como a infeção e a danificação dos tecidos. Quando a resposta inflamatória é bem sucedida ocorre apenas durante um curto período de tempo, resultando na eliminação ativa do agente infeccioso e reparação dos tecidos restabelecendo a homeostase, no entanto, nos casos em que o estímulo persiste a inflamação torna-se crónica predispondo o hospedeiro para o desenvolvimento de doenças (Medzhitov, 2008).

O processo inflamatório envolve o recrutamento e ativação de células do sistema imunológico, entre as quais se destacam os macrófagos pelo seu papel na produção de mediadores pró-inflamatórios implicados na lesão de tecidos, característica da inflamação crónica (Kumar *et al.*, 2013). A libertação desses mediadores, como por exemplo as espécies reativas de oxigénio (ROS), óxido nítrico (NO), prostaglandinas e citocinas, pode ocorrer pela sua ativação por produtos microbianos (via clássica), como o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) (Francisco *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2013). Nos macrófagos ativados, este processo é regulado por fatores de transcrição e complexas vias de transdução de sinal envolvidas na produção e ativação das formas induzíveis da sintase do NO (iNOS), responsável pela biossíntese de NO através da oxidação da L-arginina, e da ciclo-oxigenase (COX-2), catalisadora da síntese de prostaglandina E2 (PGE2) pela metabolização do ácido araquidónico (Aktan, 2004; Won *et al.*, 2006).

De uma forma mais pormenorizada, estímulos como o LPS ativam o complexo do fator nuclear kB (NF-kB) por diversas vias de transdução de sinal que levam à fosforilação da proteína inibidora deste complexo (IκB) e consequente ativação, permitindo a sua translocação para o núcleo onde induz a transcrição de genes que codificam iNOS e COX-2, entre outros mediadores pró-inflamatórios (Zhou *et al.* 2008). Além desta via, o LPS induz ainda a fosforilação de proteínas cinases dependentes de mitogénio (MAPKs), capazes de ativar a via NF-kB e regular a síntese e libertação de mediadores pró-inflamatórios, como o NO (Búfalo *et al.*, 2013).

De facto, a inflamação é hoje reconhecida como um mecanismo fisiopatológico subjacente a um grande número de doenças crónicas, como a diabetes, doenças cardiovasculares, artrite, osteoporose, determinados cancros e doenças gastrointestinais (Libby, 2007). Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO), em 2008 cerca de 63% do total de mortes em todo o mundo deveu-se a doenças crónicas e este número

tende a aumentar, refletindo o progressivo envelhecimento populacional e a persistência dos fatores de risco decorrentes do desenvolvimento económico, como a globalização de hábitos alimentares, adoção de dietas pouco saudáveis, sedentarismo e aumento do consumo de tabaco e álcool (WHO, 2011).

Os fármacos anti-inflamatórios convencionais não têm correspondido aos desafios de gestão dos impactos sociais e económicos das doenças relacionadas com a inflamação, justificando a procura de agentes terapêuticos alternativos que, ao contrário destes, sejam mais eficazes, seguros e de custo reduzido (Costa, 2012). Devido à natureza multifatorial deste tipo de doenças, a abordagem fitoterapêutica constitui uma alternativa viável por comportar a utilização de misturas complexas, como são os óleos essenciais, que contêm, para além dos compostos capazes de atuar em múltiplos alvos celulares relacionados com a doença, outros componentes responsáveis pela diminuição dos efeitos adversos e/ou aumento da biodisponibilidade (Gostner *et al.*, 2012; Efferth & Koch, 2011).

Com base neste conhecimento, o modelo *in vitro* de macrófagos estimulados por LPS tem sido amplamente adotado na investigação do potencial anti-inflamatório de diversos extratos de plantas, incluindo os óleos essenciais e seus compostos isolados, por proporcionar a elucidação do seu mecanismo de ação e evitar o sacrifício de animais em fases precoces do desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (Calixto *et al.*, 2003; Hämäläinen *et al.*, 2007; Liberal *et al.*, 2011; Francisco *et al.*, 2013; Tavares *et al.*, 2010; Valente *et al.*, 2013; Zuzarte, 2013).

Relativamente ao mecanismo de ação de vários óleos essenciais e seus compostos maioritários, foi demonstrada a sua interferência na via metabólica do ácido araquidónico, na produção de citocinas e na modulação da expressão de genes pro-inflamatórios, como reportado por Miguel (2010) no seu estudo de revisão. O potencial dos óleos essenciais como alternativas terapêuticas para o tratamento de doenças relacionadas com a inflamação é ainda reforçado pelas suas comprovadas propriedades analgésicas e capacidade de penetração pela via percutânea (Aqil *et al.*, 2007; Sousa, 2011; Saad *et al.*, 2013). Esta última possibilita a sua aplicação tópica e a promoção da absorção transdérmica de fármacos anti-inflamatórios convencionais, reduzindo a dose necessária e, conseqüentemente, a toxicidade associada (Adorjan & Buchbauer, 2010).

No que respeita às espécies de *Thymus*, apenas um reduzido número de estudos reporta a atividade anti-inflamatória dos seus óleos essenciais, destacando-se o óleo de *Thymus vulgaris* capaz de reduzir a produção de citocinas pro-inflamatórias (TNF- α , IL-

1 β , IL-8), num modelo *in vitro* de monócitos humanos (linha celular THP-1), e de inibir a atividade da 5-lipoxigenase (5-LOX), num ensaio *in vitro* usando o ácido linoleico como substrato (Tsai *et al.*, 2011).

Relativamente aos óleos essenciais de tomilhos portugueses, Albano *et al.* (2011) demonstraram a capacidade de inibição da 5-LOX dos óleos de *Thymus mastichina*, *T. camphoratus* e *T. carnosus*, e Alves (2013) comprovou o potencial anti-inflamatório destes dois últimos pela constatação do seu efeito na inibição da produção de NO a concentrações que não comprometem a viabilidade celular, pelo modelo *in vitro* utilizado no presente trabalho.

Deste modo, julgou-se importante a prossecução deste estudo avaliando-se o potencial anti-inflamatório dos óleos de *T. albicans* e *T. lotocephalus*, nomeadamente o seu efeito na produção de mediadores pro-inflamatórios chave (NO, iNOS e COX-2).

2. Material e Métodos

Os ensaios de determinação do potencial anti-inflamatório dos óleos essenciais foram realizados no Laboratório de Imunologia Celular e Oncobiologia do Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra.

2.1. Óleos essenciais

Utilizaram-se as mesmas amostras de óleo essencial de *Thymus albicans* e *Thymus lotocephalus*, previamente descritas para os ensaios de determinação da atividade antifúngica.

As diluições dos óleos essenciais foram preparadas em meio de cultura, a partir dos seus concentrados armazenados a 4°C, momentos antes da sua utilização.

2.2. Linha Celular e condições de cultura

A linha celular de macrófagos de ratinho, Raw 264,7, da American Type Culture Collection (TIB-71), foi gentilmente cedida pela Doutora Otília Vieira (Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra) e mantida em cultura em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Invitrogen) suplementado com 10 % (v/v) de soro fetal bovino não inativado (Invitrogen), 3.02 g L⁻¹ de bicarbonato de sódio (Sigma), 100 µg mL⁻¹ de estreptomicina (Sigma) e 100 U mL⁻¹ de penicilina (Sigma), mantida a 37°C em atmosfera humidificada com 5 % de CO₂ e 95 % de ar.

Para a realização dos ensaios, ressuspenderam-se as células aderentes em meio fresco (após atingirem 80 a 90% de confluência), recolheram-se por raspagem e após homogeneização, transferiram-se para um tubo falcon estéril. Para determinar a densidade da suspensão coraram-se as células com azul de tripano (Sigma), por diluição numa proporção de 1:1 (v/v), e contaram-se nos quatro quadrantes da câmara de Neubauer as células viáveis (apresentando uma coloração de cor branca brilhante por não internalizarem o corante). Ajustou-se a suspensão celular com meio de cultura fresco para a obtenção da concentração pretendida.

No decorrer dos ensaios monitorizou-se, por observação ao microscópio ótico, o aspeto morfológico das células, tendo em consideração o seu padrão de adesão e crescimento. Após 45 passagens descartaram-se as células.

2.3. Inibição da produção de óxido nítrico

O efeito dos óleos essenciais na produção de NO em macrófagos foi determinado por quantificação da acumulação de nitritos, os metabolitos estáveis de NO, no meio de cultura através da reação colorimétrica de Griess (Green *et al.*, 1982).

Nas 12 horas que precederam os tratamentos, as células foram deixadas a estabilizar numa placa de cultura de 48 poços, na concentração de $0,3 \times 10^6$ células por poço, a 37°C em atmosfera humidificada com 5 % de CO₂ e 95 % de ar. Seguidamente, substituiu-se o meio de cultura consumido por meio fresco e adicionaram-se as diluições de óleo essencial nos poços correspondentes aos tratamentos, num intervalo definido para cada amostra (de 0,02 a 1,25 $\mu\text{l ml}^{-1}$), e um controlo contendo DMSO na concentração máxima utilizada para diluir os óleos essenciais. Após 1 hora de incubação aplicou-se o estímulo, as células tratadas foram incubadas durante 24 horas na presença ou ausência de $1\mu\text{g ml}^{-1}$ de LPS, incluindo-se um controlo de células em meio de cultura e um controlo com adição de LPS. As diferentes condições foram testadas em duplicado e os ensaios repetidos 3 vezes.

Para a quantificação dos nitritos, transferiram-se 170 μL dos sobrenadantes, de cada poço, para uma placa de ELISA de 96 poços, adicionou-se igual volume de reagente de Griess preparado previamente [0,1% (m/v) de N-(1-naftil)etilenodiamina e 1% (m/v) de sulfanilamida em 5% (m/w) de ácido fosfórico (H₃PO₄)] e manteve-se no escuro durante 30 minutos à temperatura ambiente. A leitura da absorvância foi realizada num leitor automático de placas de ELISA (Synergy HT, Biotek), a um comprimento de onda de 550 nm. A concentração de nitritos determinou-se a partir de uma curva padrão de nitrito de sódio, determinada por análise de regressão.

2.4. Viabilidade Celular (ensaio do MTT)

A avaliação da viabilidade celular, após tratamento das células com diferentes concentrações de óleo essencial, foi realizada pelo método colorimétrico da redução do MTT, de acordo com o protocolo descrito por Mosmann (1983).

Os macrófagos foram deixados a estabilizar em placas de cultura de 48 poços, a uma concentração de $0,3 \times 10^6$ células por poço, durante 12 horas, mediante as condições de incubação previamente descritas. De seguida, distribuíram-se as diferentes diluições de óleo essencial pelos poços correspondentes aos tratamentos, num intervalo de concentrações definido para cada amostra (de 0,02 a 1,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$), incluindo-se um

controle de apenas células e meio. Todas as condições de teste foram testadas em duplicado. Após 24 horas, adicionaram-se 43 μL da solução de MTT, preparada em PBS (tampão fosfato salino) a 5 mg mL^{-1} , e incubaram-se as células durante 15 minutos, a 37°C. Após esse tempo, as placas foram colocadas em caixas de gelo, de forma a suspender a reação de MTT. Os sobrenadantes foram desperdiçados por aspiração e dissolveram-se os cristais de *formazan* em 300 μL de uma solução de isopropanol ácido (HCL 0,04 N). Após a dissolução total dos cristais, transferiu-se todo o volume de cada poço para uma caixa de ELISA de 96 poços e quantificou-se o *formazan* formado pela medição da absorvância num leitor automático de placas de ELISA (Synergy HT, Biotek) a um comprimento de onda de 570 nm, com um filtro de referência de 620 nm.

2.5. Mecanismo de ação

2.5.1. Atividade *scavenging*

De forma a elucidar o mecanismo de ação responsável pela inibição da produção de nitritos, testou-se o potencial dos óleos essenciais para a captação de NO usando o reagente SNAP (S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine) como dador deste metabolito.

Plaquearam-se em duplicado, numa placa de cultura de 48 poços, 300 μL de meio de cultura contendo as diluições de óleo essencial num intervalo definido para cada amostra (de 0,02 a 1,25 $\mu\text{l mL}^{-1}$) e SNAP na concentração de 300 μM por poço, incluindo-se um controlo contendo apenas meio de cultura. Após 3 horas de incubação a 37°C em atmosfera humidificada com 5 % de CO_2 e 95 % de ar, quantificou-se a produção de nitritos pelo método de Griess, referido anteriormente

2.5.2. Preparação dos lisados celulares e análise por *Western blot*

O efeito dos óleos essenciais na inibição das enzimas chave do processo inflamatório, nomeadamente iNOs e COX-2 foi avaliado por *Western blot*. As células foram deixadas a estabilizar durante 12 horas numa placa de cultura de 12 poços, a uma concentração de $1,2 \times 10^6$ células por poço. De seguida, retirou-se metade do volume de meio de cultura consumido e substituiu-se por meio fresco. Aplicaram-se nos poços respetivos os tratamentos com as concentrações de óleo essencial, às quais se verificou atividade anti-inflamatória e ausência de toxicidade. Após 1 hora de incubação aplicou-se o estímulo inflamatório (LPS) nos poços respectivos. As células tratadas foram

incubadas durante 24 horas na presença ou ausência de LPS, incluindo-se um controle de células em meio de cultura e um controle com apenas LPS. As diferentes condições foram testadas em duplicado.

Todos os procedimentos seguintes foram realizados em gelo. Rejeitaram-se os sobrenadantes por aspiração e após lavagem com PBS adicionou-se um tampão de lise [RIPA: 50 mM Tris-HCL, pH 8,0; 1 % Nonidet P-40; 150 mM NaCl; 0,5 % desoxicolato de sódio; 0,1 % SDS [dodecil sulfato de sódio] e 2 mM EDTA [ácido etilenodiamino tetra-acético]) suplementado no momento da aplicação com 1 mM de DTT (ditiotreitól) e mistura de inibidores de proteases e fosfatases. Raspam-se as células aderentes e transferiram-se para eppendorfs arrefecidos. Após 30min no gelo, os lisados celulares foram homogeneizados por sonicação (VibraCell, Sonics & Materials, Inc.) três vezes, durante 4 segundos, a 40µm e posteriormente centrifugados (eppendorf Centrifuge 5415 R) a 12 rcf, à temperatura de 4°C, durante 10 minutos, para remover os resíduos celulares. Recolheram-se os sobrenadantes (lisados celulares totais) e quantificaram-se as proteínas pelo método colorimétrico do ácido bicinonínico (BCA), baseado na capacidade das proteínas reduzirem o Cu^{2+} a Cu^{1+} , em meio alcalino. O Cu^{1+} reage com o BCA formando um complexo de cor púrpura, com intensidade diretamente proporcional à concentração de proteína, detetável por espectrofotometria a 562nm.

Realizou-se a análise por Western blot para a detecção dos níveis de iNOS e COX-2. Após a adição de volume equivalente de solução desnaturante [Tris 100 mM, bicina 100 mM, ureia 4 M, SDS 2% (m/v), β-mercaptoetanol 5% (v/v)] aos lisados celulares totais, desnaturaram-se as proteínas por aquecimento (Stuart Scientific) a aproximadamente 95°C, durante 7 minutos. Distribuíram-se volumes adequados de cada uma das amostras (30 ug/poço), separaram-se as proteínas por electroforese em gel de SDS-poliacrilamida 10 % (v/v) a 140 v, durante 1h, e transferiram-se para membranas de difluoreto de polivinildieno (previamente ativadas em metanol e estabilizadas em tampão de transferência), a 350 v durante 3,5 h ou a 40 v *overnight*, a 4°C. Após bloquear os IgGs não específicas com 5 % (m/v) de leite em tampão Tris salino (TBS, Tris-HCL 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, KCL 2.5 mM) durante 1 h, à temperatura ambiente, incubaram-se as membranas com anticorpos específicos contra iNOS (R&D) (diluído em 1% (m/v) de leite em TBS-T a 1:1000) ou COX-2 (abcam) (diluuição 1:10,000). As membranas foram lavadas durante 30 minutos com TBS-T (mudado de 5 em 5 min.), e incubadas, durante 1 h, à temperatura ambiente, com anticorpos secundários (H&G

Healthcare) conjugados com fosfatase alcalina. Depois das lavagens, como anteriormente, os imunocomplexos detetaram-se por exposição da membrana ao reagente ECF, durante um tempo máximo de 5 min, seguida de revelação usando um leitor de fluorescência (Typhoon FLA 9000). Para demonstrar a presença de quantidades equivalentes de proteína em cada uma das amostras, incubaram-se novamente as membranas lavadas, de acordo com a técnica descrita, com anticorpo contra tubulina (diluição de 1:20,000). A quantificação das bandas foi realizado com o programa TotalLab TL120.

2.6. Análise estatística

Todos os resultados são apresentados como média \pm SEM (erro padrão da média) de três ensaios independentes realizados em duplicado e repetidos sempre que se verificaram valores elevados de dispersão.

O tratamento estatístico dos dados foi realizado usando o GraphPad Prism versão 5.02. Realizou-se uma análise de variâncias de uma via (ANOVA) com pós-teste de Dunnett's, a fim de detetar a existência de diferenças significativas entre os tratamentos com diferentes concentrações de óleo essencial e o controlo de células mantidas em meio de cultura ou estimuladas com LPS (níveis de significância: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Com a realização de um test-t, verificou-se a existência de diferenças significativas entre o tratamento das células apenas com LPS e controlo (níveis de significância: # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$).

3. Resultados

3.1. Inibição da produção de NO e viabilidade celular

Os resultados referentes à inibição da produção de NO e viabilidade celular são apresentados na figura 1 e 2 para cada um dos óleos essenciais, permitindo a sua análise conjunta e extrapolação quanto ao potencial dos mesmos como agentes anti-inflamatórios.

3.1.1. *Thymus albicans*

A produção de nitritos em macrófagos estimuladas com LPS foi significativamente ($p < 0,001$) superior ao controlo, correspondente a células inoculadas

apenas com meio de cultura (Fig. 7a). Na concentração de 0,32 e 0,64 $\mu\text{L mL}^{-1}$ o óleo essencial de *Thymus albicans* inibiu de forma significativa ($p < 0,01$ e $< 0,001$, respetivamente) a produção de nitritos em células estimuladas com LPS (Fig. 7a) sem comprometer a viabilidade celular (Fig. 7b), que se infere a partir da percentagem de redução de MTT pelas células viáveis.

De um modo geral, a produção de nitritos foi inibida de uma forma dose-dependente. No que respeita à viabilidade celular, na concentração de 1,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$ o óleo essencial revelou-se citotóxico para as células, no entanto, nas concentrações inferiores testadas (0,08-0,64 $\mu\text{L mL}^{-1}$) o óleo é ausente de toxicidade não apresentando diferenças significativas, quer comparativamente ao controlo de células inoculadas em meio de cultura, quer entre os tratamentos (Fig. 7b).

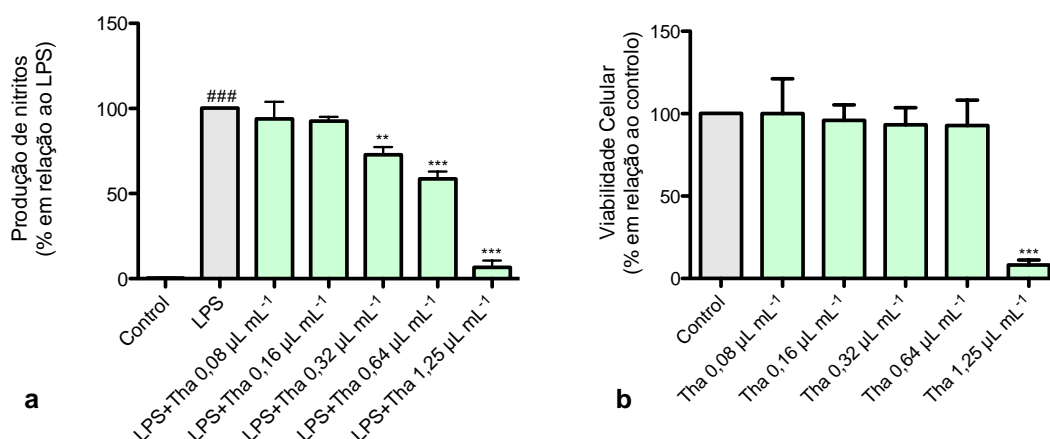


Figura 7. Efeito do óleo essencial de *Thymus albicans* (Tha) na produção de nitritos por macrófagos (Raw 264,7) estimulados com LPS (a) e na sua viabilidade celular (ensaio do MTT) (b). As células ($0,3 \times 10^6$ células/poço) foram mantidas durante 24h em meio de cultura (controlo), ou estimuladas com $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de LPS, ou na presença de LPS com diferentes concentrações de óleo essencial (0,08-1,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$). Os resultados são expressos como percentagem de produção de nitritos pelas células na presença de LPS (a) (** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, em relação ao LPS; ### $p < 0,001$, em relação ao controlo) e como percentagem de redução de MTT (b) (*** $p < 0,001$, em relação ao controlo). Cada valor corresponde à média \pm SEM de três ensaios independentes, realizadas em duplicado.

3.1.2. *Thymus lotocephalus*

Tal como referido anteriormente, a produção de nitritos pelas células estimuladas com LPS foi significativamente ($p < 0,001$) superior ao controlo. O óleo essencial de *Thymus lotocephalus* não inibiu a produção de nitritos pelas células tratadas com LPS (Fig. 8a) sem comprometer a viabilidade celular (Fig. 8b).

No intervalo de concentrações de 0,32 a 1,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$ o óleo essencial revelou percentagens significativas de citotoxicidade para as células, estando a inibição da produção de NO relacionado com a morte celular. O efeito do óleo essencial ocorreu de forma dose-dependente para os dois parâmetros avaliados.

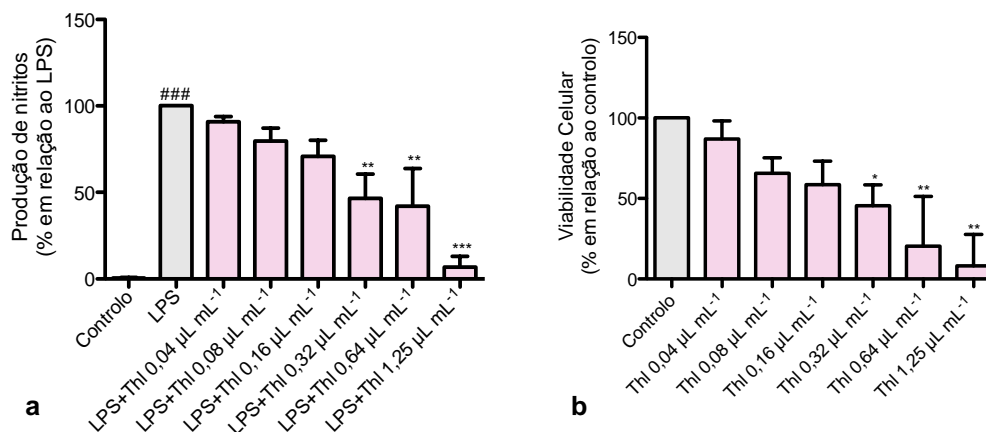


Figura 8. Efeito do óleo essencial de *Thymus lotocephalus* (Thl) na produção de nitritos por macrófagos (Raw 264,7) estimulados com LPS (a) e na sua viabilidade celular (ensaio do MTT) (b). As células ($0,3 \times 10^6$ células/poço) foram mantidas durante 24h em meio de cultura (controlo), ou estimuladas com $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de LPS, ou na presença de LPS com diferentes concentrações de óleo essencial ($0,08$ - $1,25 \mu\text{L mL}^{-1}$). Os resultados são expressos como percentagem de produção de nitritos pelas células na presença de LPS (a) (** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, em relação ao LPS; ### $p < 0,001$, em relação ao controlo) e como percentagem de redução de MTT (b) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, em relação ao controlo). Cada valor corresponde à média \pm SEM de três ensaios independentes, realizadas em duplicado.

3.2. Mecanismo de ação

3.2.1. Atividade scavenging

A quantidade de nitritos na presença de SNAP, um dador de NO, foi significativamente ($p < 0,001$) superior ao controlo, correspondendo apenas a meio de cultura. O óleo essencial de *Thymus albicans* não demonstrou atividade de scavenging, visto que a percentagem de nitritos não variou significativamente, em comparação com o SNAP (Fig.9).

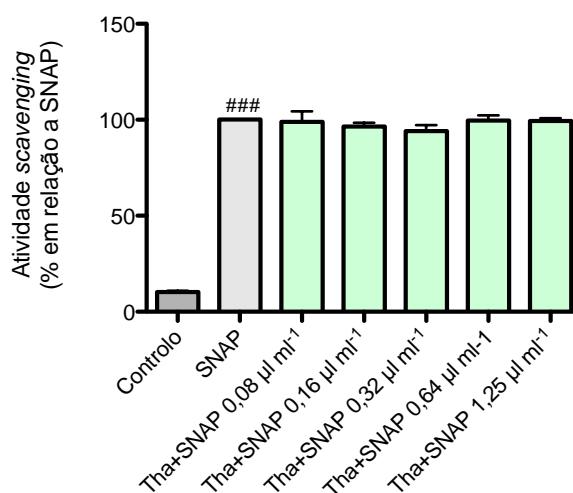


Figura 9. Efeito *scavenging* do óleo essencial de *Thymus albicans* (Tha).. Diferentes concentrações de óleo essencial (0,08-1,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$) foram incubadas com 3 $\mu\text{L mL}^{-1}$ do dador de NO, SNAP (100 mM), em meio de cultura durante 3h. Os resultados são expressos como percentagem de NO na presença de SNAP. (### $p < 0,001$, em relação ao controlo). Cada valor corresponde à média \pm SEM de três ensaios independentes, realizadas em duplicado.

3.2.2. Níveis de proteína iNOS e COX-2

A expressão das proteínas iNOS (Fig. 10) e COX-2 (Fig. 11) em macrófagos estimulados com LPS foi significativamente ($p < 0,001$) superior ao controlo, correspondente a células inoculadas apenas com meio de cultura. Na concentração de 0,64 $\mu\text{L mL}^{-1}$ o óleo essencial de *Thymus albicans* inibiu de forma significativa ($p < 0,05$) a expressão da iNOS, em cerca de 15%. Não se verificou inibição da expressão de COX-2.

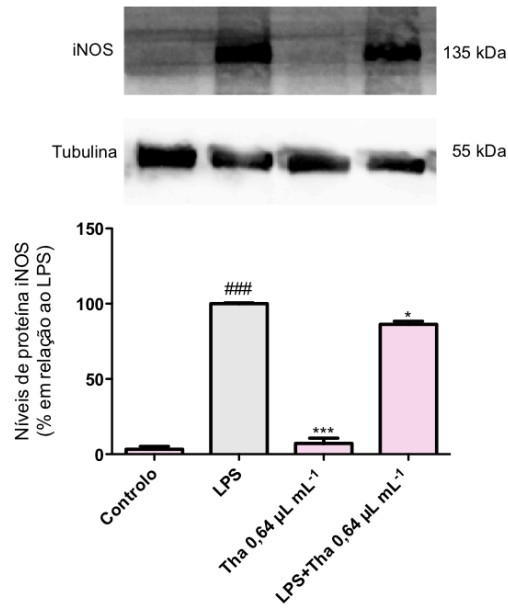


Figura 10. Efeito do óleo essencial de *Thymus albicans* (Tha) na expressão de proteína iNOS em macrófagos (Raw 264,7) estimulados por LPS. As células ($1,2 \times 10^6$ células/poço) foram mantidas durante 24h em meio de cultura (controlo), ou estimuladas com $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de LPS, ou na presença de LPS com óleo essencial na concentração de $0,64 \mu\text{L mL}^{-1}$. Os resultados são expressos como percentagem dos níveis de proteína em relação ao LPS. Cada valor corresponde à média \pm SEM de três ensaios independentes (### $p < 0.001$, comparado com o controlo).

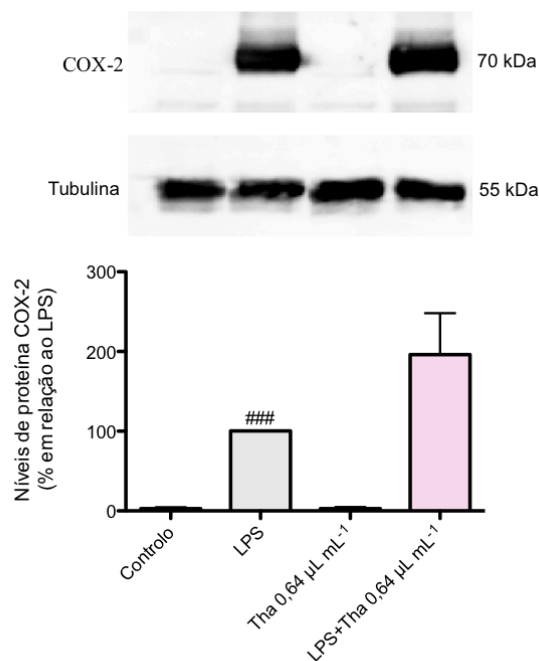


Figura 11. Efeito do óleo essencial de *Thymus albicans* (Tha) na expressão de proteína COX-2 em macrófagos (Raw 264,7) estimulados por LPS. As células ($1,2 \times 10^6$ células/poço) foram mantidas durante 24h em meio de cultura (controlo), ou estimuladas com $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de LPS, ou

na presença de LPS com óleo essencial na concentração de $0,64 \mu\text{L mL}^{-1}$. Os resultados são expressos como percentagem dos níveis de proteína em relação ao LPS. Cada valor corresponde à média \pm SEM de três ensaios independentes (### $p < 0.001$, comparado com o controlo).

4. Discussão

No presente estudo, a atividade anti-inflamatória dos óleos essenciais foi determinada usando o modelo *in vitro* de macrófagos de ratinho (Raw 264,7) estimulados por LPS. O lipopolissacarídeo bacteriano, é um constituinte da membrana externa de bactérias Gram-negativas capaz de estimular a produção de NO pela forma induzível da sua sintase, iNOS (Aktan, 2004). Este, por ser um mediador celular particularmente sobreproduzido em processos patológicos de natureza inflamatória, é um parâmetro amplamente utilizado para a descoberta de novos agentes anti-inflamatórios (Gilroy *et al.* 2004). Deste modo, determinou-se o efeito de diferentes concentrações dos óleos essenciais de *T. albicans* e *T. lotocephalus* na inibição da produção de NO em macrófagos sujeitos ao estímulo.

Visto que o NO possui um tempo de meia vida muito curto, originando nitritos em solução aquosa, a sua quantificação é determinada indiretamente pela quantificação desses metabolitos, através da reação colorimétrica de Griess (Green *et al.*, 1982), durante a qual os nitritos presentes no meio de cultura sofrem diazotação com a sulfanilamida, formando um sal de diazónio, que posteriormente se liga a N-(1-naftil)etilenodiamina, formando um composto de cor rosa, quantificável por espectrofotometria.

Adicionalmente, a fim de relacionar a bioatividade e segurança dos óleos essenciais, realizou-se um ensaio de avaliação da citotoxicidade dos óleos essenciais nos macrófagos, pela determinação do seu efeito na viabilidade celular, que se infere a partir da percentagem de redução de MTT pelas células viáveis, como descrito no capítulo anterior.

Os resultados obtidos demonstraram o potencial anti-inflamatório do óleo essencial de *T. albicans* (rico em 1,8-cineol), com elevado teor em 1,8-cineol, uma vez que este tem a capacidade de inibir significativamente a produção de nitritos em macrófagos estimuladas por LPS, a concentrações que não comprometem a viabilidade celular ($0,32$ e $0,64 \mu\text{L mL}^{-1}$). Usando o mesmo modelo, Zuzarte (2013) avaliou isoladamente o efeito do 1,8-cineol na inibição da produção de NO, demonstrando que

este inibiu a produção de nitritos a concentrações muito superiores ($2,5 \mu\text{L mL}^{-1}$) às que se verificaram para o óleo de *T. albicans*. Tais resultados, sugerem a influência de outros compostos presentes em menores concentrações, justificando estudos futuros com outros constituintes do óleo essencial, como por exemplo o linalol, borneol e terpineol, ou frações enriquecidas em determinados constituintes.-

Uma vez que, a inibição da produção de nitritos pelo óleo essencial de *T. lotocephalus* se atribui à sua toxicidade para as células e consequente morte celular, prosseguiu-se com o estudo de elucidação do mecanismo de ação apenas para o óleo essencial de *T. albicans*.

Primeiramente, avaliou-se a atividade “scavenging” do óleo essencial de *T. albicans* recorrendo a um dador de NO (SNAP). Os resultados mostraram que o óleo não apresenta capacidade sequestrante do NO excluído esta hipótese para justificar a redução da quantidade de nitritos quantificados. Adicionalmente, foram também quantificados os níveis de expressão de iNOS e COX-2, enzimas chave no processo inflamatório, em macrófagos estimulados por LPS, sujeitos à concentração bioativa mais elevada ($0,64 \mu\text{L mL}^{-1}$) de óleo de *T. albicans*. Os resultados revelaram que o óleo essencial é capaz de inibir seletivamente a expressão da proteína iNOS em cerca de 15% ($p < 0,05$) não sendo efectivo na inibição da expressão de COX-2. Estes dados permitem inferir que a capacidade do óleo essencial inibir a produção de nitritos está relacionado com a sua efeito na inibição da enzima responsável pela produção de NO (iNOS). No entanto, outros mecanismos de ação poderão estar envolvidos. De referir que, estes ensaios permitem apenas avaliar os níveis de expressão das proteínas mas não indicam se a atividade das mesmas está comprometida. Nesse sentido, ensaios futuros que permitam avaliar este parâmetro são justificáveis. De facto, Paena *et al.* (2006) demonstraram que o linalol é capaz de inibir a libertação de NO, num modelo *in vitro* (macrófagos J774.A1), apesar de ser ineficaz na inibição da expressão de iNOS, indicando que a atividade inibitória do linalol se deve à sua interferência na atividade da enzima. Além disso, será também pertinente avaliar o efeito do óleo na ativação do fator de transcrição nuclear kappa B e sua migração para o núcleo, uma etapa essencial na cascata de sinalização conducente à expressão de diversos mediadores inflamatórios como a iNOS, COX-2, factor de necrose tumoral alfa (TNF)- α e interleucinas (IL)-1 β , IL-6 e IL-8 (Scheidereit, 2006; Wong and Tergaonkar, 2009) .

5. Bibliografia

- Adorjan, B., & Buchbauer, G. (2010). Biological properties of essential oils: an updated review. *Flavour and Fragrance Journal*, 25(6), 407-426.
- Alves, M. P. (2013). Avaliação das potencialidades medicinais de *Thymus camphoratus* Hoffmanns. & Link. e *Thymus carnosus* Boiss. Dissertação de Mestrado. Universidade de Coimbra. Coimbra, Portugal.
- Albano, S. M., & Miguel, M. G. (2011). Biological activities of extracts of plants grown in Portugal. *Industrial Crops and Products*, 33(2), 338-343.
- Aktan, F. (2004). iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life sciences*, 75(6), 639-653.
- Aqil, M., Ahad, A., Sultana, Y., & Ali, A. (2007). Status of terpenes as skin penetration enhancers. *Drug Discovery Today*, 12(23), 1061-1067.
- Búfalo, M. C., Ferreira, I., Costa, G., Francisco, V., Liberal, J., Cruz, M. T., Lopes, M. C., Batista, M. T., Sforcin, J. M. (2013). Propolis and its constituent caffeic acid suppress LPS-stimulated pro-inflammatory response by blocking NF- κ B and MAPK activation in macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*, 149(1), 84-92.
- Calixto, J. B., Otuki, M. F., Santos, A. R. S. (2003). Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor kappa B (NF-kappaB). *Planta Medica*, 69, 973-983.
- Costa, G., Francisco, V., C Lopes, M., T Cruz, M., & T Batista, M. (2012). Intracellular signaling pathways modulated by phenolic compounds: application for new anti-inflammatory drugs discovery. *Current Medicinal Chemistry*, 19(18), 2876-2900.

- Efferth, T., & Koch, E. (2011). Complex interactions between phytochemicals. The multi-target therapeutic concept of phytotherapy. *Current Drug Targets*, 12(1), 122-132.
- Francisco, V., Figueirinha, A., Neves, B. M., García-Rodríguez, C., Lopes, M. C., Cruz, M. T., & Batista, M. T. (2011). *Cymbopogon citratus* as source of new and safe anti-inflammatory drugs: Bio-guided assay using lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*, 133(2), 818-827.
- Francisco, V., Costa, G., Figueirinha, A., Marques, C., Pereira, P., Neves, B. M. *et al.* (2013). Anti-inflammatory activity of *Cymbopogon citratus* leaves infusion via proteasome and nuclear factor- κ B pathway inhibition: Contribution of chlorogenic acid. *Journal of Ethnopharmacology*, 148(1), 126-134.
- Gilroy, D. W., Lawrence, T., Perretti, M., & Rossi, A. G. (2004). Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 3(5), 401-416.
- Gostner, J. M., Wrulich, O. A., Jenny, M., Fuchs, D., & Ueberall, F. (2012). An update on the strategies in multicomponent activity monitoring within the phytopharmaceutical field. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12(1), 18.
- Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S. & Tannenbaum, S.R. (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [^{15}N]nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry* 126:131-138.
- Hämäläinen, M., Nieminen, R., Vuorela, P., Heinonen, M., & Moilanen, E. (2007). Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF- κ B activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF- κ B activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. *Mediators of Inflammation*

- Juhás, S., Cikos, S., Czikková, S., Veselá, J., Il kova, G., Hájek, T., ... & Koppel, J. (2008). Effects of borneol and thymoquinone on TNBS-induced colitis in mice. *Folia Biologica-Praha*, 54(1), 1.
- Kumar, V., Abbas, A. K., Aster, J. C. (2013). Inflammation and repair. In: *Robbins Basic Pathology* (29-72). ELSEVIER, SAUNDERS.
- Libby, P. (2007). Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease. *Nutrition Reviews*, 65(s3), S140-S146.
- Liberal, J. T., Francisco, V., Amaral, M. T., Marques, C., Lopes, M. C., Cruz, M. T., & Batista, M. T. (2011). Mechanism of action of *Fragaria vesca* leaf extract on LPS treated macrophages. *Planta Medica*, 77(12), PM106.
- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203), 428-435.
- Miguel, M. G. (2010). Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. *Molecules*, 15(12), 9252-9287.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63
- Peana, A. T., Marzocco, S., Popolo, A., & Pinto, A. (2006). (-)-Linalool inhibits in vitro NO formation: Probable involvement in the antinociceptive activity of this monoterpene compound. *Life sciences*, 78(7), 719-723.
- Saad, N. Y., Muller, C. D., & Lobstein, A. (2013). Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. *Flavour and Fragrance Journal*, 28(5), 269-279.

- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M., ... & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry*, *150*(1), 76-85.
- Sousa, D. P. (2011). Analgesic-like activity of essential oils constituents. *Molecules*, *16*(3), 2233-2252.
- Scheidereit C. 2006. I κ B kinase complexes: gateways to NF- κ B activation and transcription. *Oncogene* *25*, 6685–6705.
- Tavares, A. C., Gonçalves, M. J., Cruz, M. T., Cavaleiro, C., Lopes, M. C., Canhoto, J., & Salgueiro, L. R. (2010). Essential oils from *Distichoselinum tenuifolium*: Chemical composition, cytotoxicity, antifungal and anti-inflammatory properties. *Journal of Ethnopharmacology*, *130*(3), 593-598.
- Tsai, M. L., Lin, C. C., Lin, W. C., & Yang, C. H. (2011). Antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory activities of essential oils from five selected herbs. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *75*(10), 1977-1983.
- Valente, J., Zuzarte, M., Liberal, J., Gonçalves, M. J., Lopes, M. C., Cavaleiro, C., Cruz, M. T., Salgueiro, L. (2013). *Margotia gummifera* essential oil as a source of anti-inflammatory drugs. *Industrial Crops and Products*, *47*, 86-91.
- WHO (2011). *Global status report on noncommunicable diseases 2010*. World Health Organization.
- Won, J. H., Im, H. T., Kim, Y. H., Yun, K. J., Park, H. J., Choi, J. W., & Lee, K. T. (2006). Anti-inflammatory effect of buddlejasaponin IV through the inhibition of iNOS and COX-2 expression in RAW 264.7 macrophages via the NF- κ B inactivation. *British Journal of Pharmacology*, *148*(2), 216-225.
- Wong E.T., Tergaonkar V. 2009. Roles of NF-kappaB in health and disease: mechanisms and therapeutic potential. *Clinical Science* *116*, 451–465.

Zhou, H. Y., Shin, E. M., Guo, L. Y., Youn, U. J., Bae, K., Kang, S. S. *et al.* (2008). Anti-inflammatory activity of 4-methoxyhonokiol is a function of the inhibition of iNOS and COX-2 expression in RAW 264.7 macrophages via NF- κ B, JNK and p38 MAPK inactivation. *European Journal of Pharmacology*, 586(1), 340-349.

Zuzarte, M. R. (2013). Portuguese lavenders: evaluation of their potential use for health and agricultural purposes. Tese de doutoramento. Universidade de Coimbra. Coimbra, Portugal.

IV. VIABILIDADE CELULAR

1. Introdução

Nos últimos anos, a investigação das propriedades bioativas dos óleos essenciais e seus constituintes tem despertado o interesse de muitos investigadores, com estudos a reportar a sua atividade antifúngica, antiviral, antibacteriana, anti-protozoa, inseticida e repelente de insetos, anti-inflamatória, analgésica, anti-cancerígena, antioxidante e anti-radicalar, comprovando, muitas vezes, evidências do seu uso tradicional (Dorman *et al.* 2000; Isman *et al.*, 2007; Koch *et al.*, 2008; Palmeira-de-Oliveira *et al.*, 2009; Adorjan & Buchbauer, 2010; Miguel, 2010; Nerio *et al.*, 2010; Astani *et al.*, 2011; Sousa, 2011; Zuzarte *et al.*, 2011; Saeidnia & Gohari, 2012; Monzote *et al.*, 2012; Timsina *et al.*, 2013).

A extensiva história de uso tradicional e/ou validação científica, em conjugação com o renovado interesse dos consumidores por produtos de origem natural, tem impulsionado o desenvolvimento da aromaterapia (que envolve o uso terapêutico dos óleos essenciais por aplicação oral, tópica e inalação), bem como o aumento do uso industrial de óleos essenciais para a preservação e aromatização de alimentos, produtos de higiene e cosméticos (Tisserand & Young, 2014).

No que respeita à utilização dos óleos essenciais como aditivos alimentares, instituições como a *Food and Drugs Administration* (FDA) reconhecem-nos como seguros, com base nas evidências acima mencionadas (Tajkarimi *et al.*, 2010).

Relativamente ao seu uso na terapêutica, a complexidade que os caracteriza, e à qual se atribuem as vantagens que foram sendo inumeradas ao longo deste trabalho, dificulta a elucidação dos riscos de toxicidade, determinação da dose terapêutica, margem de segurança e interações com outras substâncias, pontos cruciais para o seu estabelecimento como alternativas/complementos terapêuticos (Hopkins *et al.*, 2006; Baser & Buchbauer, 2009). Deste modo, muitos produtos à base de plantas com relevância farmacológica, incluindo os óleos essenciais e suas formulações, têm sido comercializados como suplementos alimentares de forma a facilitar a sua introdução no mercado, muitas vezes sem estudos que suportem a sua segurança e eficácia (Gostner *et al.*, 2012).

A citotoxicidade dos óleos essenciais para os organismos patogénicos responsáveis pela infeção de humanos, animais e contaminação de produtos agro-alimentares, é o fator determinante para a sua relevância no controlo destes agentes (Bakkali *et al.*, 2008). De igual modo, a citotoxicidade para as células tumorais confere-

lhes atividade anticancerígena (Edris, 2007; Loizzo *et al.*, 2007). No entanto, para que seja segura a sua utilização terapêutica, deve assegurar-se que os óleos essenciais não comprometam a viabilidade celular nas concentrações em que apresentam bioatividade. Por vezes são reportados efeitos adversos decorrentes das suas aplicações tópica e oral, toxicidade e interações com fármacos convencionais (Reichling *et al.*, 2009).

Entres outras metodologias desenvolvidas para a substituição dos testes toxicológicos em animais, a utilização de modelos *in vitro* de linhas celulares tem sido amplamente adotada na investigação da toxicidade dos óleos essenciais, por estas se encontrarem bem caracterizadas e serem de mais fácil cultivo do que as culturas primárias de células (Zuzarte, 2013).

Alguns estudos têm evidenciado a bioatividade de óleos essenciais de tomilhos a concentrações não tóxicas, como por exemplo, o óleo essencial de *Thymus vulgaris*, reportado por Kumar *et al.* (2008) como eficaz no controlo de fungos responsáveis pela contaminação de produtos alimentares sem toxicidade para ratinhos, usando um modelo *in vivo*. Pelo contrário, Zuzarte e colaboradores (2013) demonstraram a toxicidade do óleo essencial de *Thymus herba-barona* na linha celular de macrófagos de ratinho (Raw 264,7), a concentrações muito reduzidas (0,04 $\mu\text{L mL}^{-1}$).

Relativamente aos tomilhos portugueses, Gonçalves *et al.* (2010) reportaram a atividade antifúngica de *Thymus zygis* subsp. *sylvestris* a concentrações que não comprometem a viabilidade celular numa linha celular dendrítica da pele de rato (FSDC) e Alves (2013) realça a atividade antifúngica e anti-inflamatória do óleo essencial de *Thymus carnosus* a concentrações não tóxicas numa linha de celular de macrófagos de ratinho (Raw 264,7).

Após confirmação da atividade antifúngica do óleo essencial de *Thymus albicans* contra um largo espectro de fungos patogénicos para humanos, animais e contaminantes de alimentos, e do seu potencial anti-inflamatório a concentrações não tóxicas para os macrófagos de ratinho, considerou-se de extrema relevância testar o seu efeito na viabilidade celular de linhas celulares de queratinócitos e hepatócitos, para uma validação preliminar da sua segurança em futuras aplicações tópicas e/ou orais, respetivamente.

2. Materiais e Métodos

Os ensaios de avaliação da citotoxicidade dos óleos essenciais usando modelos *in vitro* de linhas celulares de queratinócitos (HaCat) e hepatócitos (HepG2) humanos foram realizados no Laboratório de Imunologia Celular e Oncobiologia do Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra.

2.1. Linhas celulares

A linha celular de queratinócitos humanos, HaCat (DKFZ), foi gentilmente cedida pela Doutora Eugénia de Carvalho (Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra), mantida em cultura em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 10 % (v/v) de soro fetal bovino inativado, 3,02 g L⁻¹ de bicarbonato de sódio, 100 µg mL⁻¹ de estreptomicina e 100 U mL⁻¹ de penicilina, mantida a 37°C em atmosfera humidificada com 5 % de CO₂ e 95 % de ar.

A linha celular de hepatócitos humanos, HepG2, (ATCC HB-8065) foi cultivada em meio DMEM suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino inativado, 1,5 g L⁻¹ de bicarbonato de sódio, 100 µg mL⁻¹ de estreptomicina e 100 U mL⁻¹ de penicilina, mantida a 37°C em atmosfera humidificada com 5 % de CO₂ e 95 % de ar.

Para a realização dos ensaios, o meio de cultura consumido foi recolhido por aspiração, as células foram lavadas com PBS e incubadas durante 5 minutos com 3 a 4 mL de tripsina. As células, depois de ressuspensas em meio de cultura fresco, foram transferidas para tubos falcons e centrifugadas (Sorvall, RT 6000D) a 1,320rpm, durante 10 minutos. Rejeitou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellett* de células em meio de cultura. Para determinar a densidade da suspensão coraram-se as células com azul de tripano (Sigma), por diluição numa proporção de 1:1 (v/v), e contaram-se nos quatro quadrantes da câmara de Neubauer as células viáveis. Ajustou-se a suspensão celular com meio de cultura para a obtenção da concentração pretendida.

No decorrer dos ensaios monitorizou-se, por observação ao microscópio ótico, o aspeto morfológico das células, tendo em consideração o seu padrão de adesão e crescimento. Usaram-se células com 80 a 90% de confluência e após 45 passagens descartaram-se.

2.2. Viabilidade celular

A avaliação da viabilidade celular, após tratamento com diferentes concentrações de óleo essencial, foi realizada pelo método colorimétrico da redução do MTT, de acordo com a metodologia referida no capítulo anterior. Os queratinócitos e hepatócitos foram cultivados em placas de cultura de 48 poços, a uma concentração de $0,2 \times 10^6$ e $0,16 \times 10^6$ células por poço, respetivamente. Após 12 horas de incubação, mediante as condições previamente descritas, distribuíram-se as diferentes diluições de óleo essencial pelos poços correspondentes aos tratamentos, num intervalo de concentrações definido para cada amostra (de 0,08 a $1,25 \mu\text{L mL}^{-1}$), incluindo-se um controlo de apenas células e meio. Todas as condições foram testadas em duplicado. Depois de submetidas aos tratamentos durante 24 horas, adicionaram-se $60 \mu\text{L}$ da solução de MTT, preparada em PBS a 5 mg mL^{-1} , e incubaram-se as células durante 30 minutos para as HaCat e 1 hora para as HepG2, a 37°C numa atmosfera humidificada com 5 % de CO_2 e 95 % de ar. Mantendo as placas em gelo, desperdiçaram-se os sobrenadantes por aspiração e dissolveram-se os cristais de *formazan* em $300 \mu\text{L}$ de uma solução de isopropanol ácido (HCL 0,04 N). Após a dissolução total dos cristais, transferiu-se todo o volume de cada poço para uma placa de ELISA de 96 poços e quantificou-se o *formazan* pela medição da absorvância num leitor automático de placas de ELISA (Synergy HT, Biotek) a 570 nm, com um filtro de referência de 620 nm.

2.3. Análise estatística

Os resultados são apresentados como média \pm SEM (erro padrão da média) de três ensaios realizados em duplicado de forma independente, repetidos sempre que se verificaram valores elevados de dispersão.

O tratamento estatístico dos dados foi realizado usando o GraphPad Prism versão 5.02. Realizou-se uma análise de variâncias de uma via (ANOVA) com pós-teste de Dunnett's, a fim de detetar a existência de diferenças significativas entre os tratamentos com diferentes concentrações de óleo essencial e o controlo de células mantidas em meio de cultura (níveis de significância: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

3. Resultados

3.1. Viabilidade Celular

Queratinócitos (HaCat)

Os resultados demonstram (Fig. 12) que o óleo essencial de *T. albicans* apresenta toxicidade significativa ($p < 0,001$) para os queratinócitos nas concentrações de 0,64 e 1,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$, em relação ao controlo de células mantidas apenas em meio de cultura. Nas restantes concentrações, 0,08 a 0,32 $\mu\text{L mL}^{-1}$, a viabilidade celular é superior a 80%.

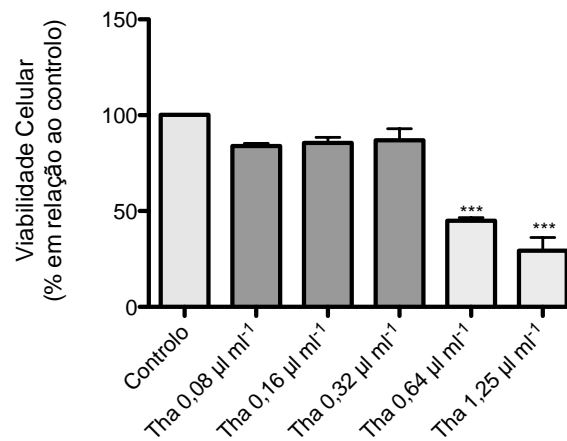


Figura 12. Efeito do óleo essencial de *Thymus albicans* (Tha) na viabilidade celular de queratinócitos humanos (ensaio do MTT). As células (2×10^6 células/poço) foram mantidas durante 24h em meio de cultura (controlo) ou na presença de diferentes concentrações de óleo essencial (0,16-1,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$). Os resultados são expressos como percentagem de redução de MTT (***) $p < 0,001$, em relação ao controlo). Cada valor corresponde à média \pm SEM de três ensaios independentes, realizadas em duplicado. As barras destacadas a verde escuro indicam concentrações não tóxicas.

Hepatócitos (HepG2)

Para os hepatócitos (Fig. 13), o óleo essencial de *T. albicans* revela toxicidade, em relação ao controlo, nas concentrações de 0,64 e 1,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$, com $p < 0,01$ e 0,05, respetivamente. Na concentração de 0,16 $\mu\text{L mL}^{-1}$, a viabilidade celular é de 100%.

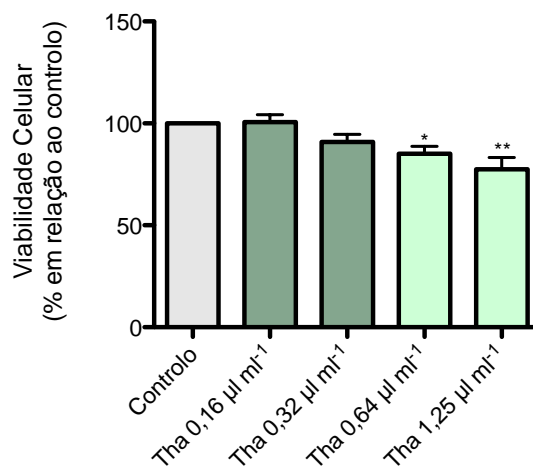


Figura 13. Efeito do óleo essencial de *Thymus albicans* (Tha) na viabilidade celular de hepatócitos humanos (ensaio do MTT). As células ($0,16 \times 10^6$ células/poço) foram mantidas durante 24h em meio de cultura (controlo) ou na presença de diferentes concentrações de óleo essencial ($0,16$ - $1,25 \mu\text{L mL}^{-1}$). Os resultados são expressos como percentagem de redução de MTT (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, em relação ao controlo). Cada valor corresponde à média \pm SEM de três ensaios independentes, realizadas em duplicado. As barras destacadas a verde escuro indicam concentrações não tóxicas.

4. Discussão

Reunindo os resultados obtidos para todas as linhas celulares, nomeadamente de macrófagos de ratinho (Raw 264,7), queratinócitos (HaCat) e hepatócitos (HepG2) humanos, pode inferir-se que o óleo essencial de *Thymus albicans*, rico maioritariamente em 1,8-cineol e linalol, revela menor toxicidade para os macrófagos, sendo tóxico apenas na concentração de 1,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$. No que respeita aos queratinócitos e hepatócitos a toxicidade é semelhante, revelando-se tóxico nas concentrações de 0,64 e 1,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$. No entanto, na concentração de 0,16 $\mu\text{L mL}^{-1}$ o óleo essencial não compromete a viabilidade celular dos hepatócitos.

O óleo essencial de *Lavandula viridis* caracterizado pelo alto teor em 1,8-cineol, estudado por Zuzarte (2013) segundo o mesmo método, também apresenta citotoxicidade para as HaCat nas concentração de 0,64 e 1,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$ e não compromete a viabilidade celular das Raw 264,7 a 0,64 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Nesse mesmo estudo, é demonstrado que mesmo a elevadas concentrações, 2,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$, o 1,8-cineol isolado não compromete a viabilidade celular de macrófagos de ratinho (Raw 264,7). De facto, na Alemanha, o 1,8-cineol está licenciado como um produto medicinal seguro para o tratamento de bronquite e outras infeções respiratórias, sendo usado em cápsulas de 100 mg, em dosagens que não excedam as 600 mg por dia (Juergens, 2003). Também o linalol, segundo composto presente em maior concentração, é reportado como seguro e sem toxicidade (Burdock & Carabin, 2009).

Importa ressaltar que, os testes toxicológicos *in vitro* tendem a superestimar a toxicidade das substâncias, uma vez que, ao contrário do que acontece num organismo vivo, os produtos metabólicos nocivos acumulados no meio de cultura não podem ser excretados ou metabolizados (Hayes & Markovic, 2002).

As limitações que acima se mencionaram, enfatizam a segurança do óleo essencial de *T. albicans* em futuras aplicações terapêuticas. Tomando em consideração os resultados apresentados nos capítulos anteriores, o facto do óleo essencial de *T. albicans* na concentração de 0,32 $\mu\text{L mL}^{-1}$ e 0,16 $\mu\text{L mL}^{-1}$ ser capaz de inibir a formação do tubo germinativo (importante fator de virulência) de *Candida albicans*, em cerca de 100 e 70%, respetivamente, e não revelar, a essas concentrações, citotoxicidade significativa para nenhuma das linhas celulares testadas, confirma o seu potencial e segurança na terapia antifúngica em humanos, com possível aplicação tópica e oral. Na concentração de 0,32 $\mu\text{L mL}^{-1}$ o óleo essencial de *T. albicans* apresenta também

atividade anti-inflamatória e, por conseguinte, configura-se como um potencial agente alternativo/complementar para a terapia anti-inflamatória.

5. Bibliografia

- Adorjan, B., & Buchbauer, G. (2010). Biological properties of essential oils: an updated review. *Flavour and Fragrance Journal*, 25(6), 407-426.
- Alves, M. P. (2013). Avaliação das potencialidades medicinais de *Thymus camphoratus* Hoffmanns. & Link. e *Thymus carnosus* Boiss. Dissertação de Mestrado. Universidade de Coimbra. Coimbra, Portugal.
- Astani, A., Reichling, J., & Schnitzler, P. (2011). Screening for antiviral activities of isolated compounds from essential oils. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446-475.
- Baser, K. H. C., & Buchbauer, G. (Eds.). (2009). *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications*. CRC Press.
- Burdock, G. A., & Carabin, I. G. (2009). Safety assessment of coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil as a food ingredient. *Food and Chemical Toxicology*, 47(1), 22-34.
- Dorman, H. J. D., & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2), 308-316.
- Edris, A. E. (2007). Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytotherapy Research*, 21(4), 308-323.
- Gonçalves, M. J., Cruz, M. T., Cavaleiro, C., Lopes, M. C., & Salgueiro, L. (2010). Chemical, antifungal and cytotoxic evaluation of the essential oil of *Thymus zygis* subsp. *sylvestris*. *Industrial Crops and Products*, 32(1), 70-75.

- Gostner, J. M., Wrulich, O. A., Jenny, M., Fuchs, D., & Ueberall, F. (2012). An update on the strategies in multicomponent activity monitoring within the phytopharmaceutical field. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12(1), 18.
- Hayes, A. J., & Markovic, B. (2002). Toxicity of Australian essential oil *Backhousia citriodora* (Lemon myrtle). Part 1. Antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity. *Food and Chemical Toxicology*, 40(4), 535-543.
- Hopkins, A. L., Mason, J. S., & Overington, J. P. (2006). Can we rationally design promiscuous drugs?. *Current Opinion in Structural Biology*, 16(1), 127-136.
- Isman, M. B., Machial, C. M., Miresmailli, S., & Bainard, L. D. (2007). Essential oil-based pesticides: new insights from old chemistry. *Pesticide Chemistry*. Wiley-VCH Verlag GmbH and Co.
- Juergens, U. R., Dethlefsen, U., Steinkamp, G., Gillissen, A., Repges, 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.
- Koch, C., Reichling, J., Schneelee, J., & Schnitzler, P. (2008). Inhibitory effect of essential oils against herpes simplex virus type 2. *Phytomedicine*, 15(1), 71-78.
- Kumar, A., Shukla, R., Singh, P., Prasad, C. S., & Dubey, N. K. (2008). Assessment of *Thymus vulgaris* L. essential oil as a safe botanical preservative against post harvest fungal infestation of food commodities. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(4), 575-580.
- Loizzo, M. R., Tundis, R., Menichini, F., Saab, A. M., Statti, G. A., & Menichini, F. (2007). Cytotoxic activity of essential oils from Labiatae and Lauraceae families against in vitro human tumor models. *Anticancer Research*, 27(5A), 3293-3299.
- Miguel, M. G. (2010). Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. *Molecules*, 15(12), 9252-9287.

- Monzote, L., Alarcón, O., & Setzer, W. N. (2012). Antiprotozoal activity of essential oils. *Agriculturae Conspectus Scientificus (ACS)*, 77(4), 167-175.
- Nerio, L. S., Olivero-Verbel, J., & Stashenko, E. (2010). Repellent activity of essential oils: a review. *Bioresource Technology*, 101(1), 372-378.
- Palmeira-de-Oliveira, A., Salgueiro, L., Palmeira-de-Oliveira, R., Martinez-de-Oliveira, J., Pina-Vaz, C., Queiroz, J. A., & Rodrigues, A. G. (2009). Anti-*Candida* activity of essential oils. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 9(11), 1292-1305.
- Reichling, J., Schnitzler, P., Suschke, U., & Saller, R. (2009). Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties—an overview. *Forschende Komplementärmedizin/Research in Complementary Medicine*, 16(2), 79-90.
- Saeidnia, S., & Gohari, A. R. (2012). Trypanocidal monoterpenes, Lead compounds to design future trypanocidal drugs. *Studies in Natural Product Chemistry*, 37, 173-189.
- Sousa, D. P. (2011). Analgesic-like activity of essential oils constituents. *Molecules*, 16(3), 2233-2252.
- Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A., & Cliver, D. O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21(9), 1199-1218.
- Tisserand, R., & Young, R. (2014). *Essential oil safety: a guide for health care professionals*. Elsevier Health Sciences.
- Zuzarte, M., Gonçalves, M. J., Canhoto, J., & Salgueiro, L. (2011). Antidermatophytic activity of essential oils. In: A. Méndez-Vilas (ed.) *Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances* (1167-1178). *Microbiology Book Series*, n°3, 2.

Zuzarte, M., Gonçalves, M. J., Cavaleiro, C., Cruz, M. T., Benzarti, A., Marongiu, B., Maxia, A., Piras, A., Salgueiro, L. (2013). Antifungal and anti-inflammatory potential of *Lavandula stoechas* and *Thymus herba-barona* essential oils. *Industrial Crops and Products*, 44, 97-103.

Zuzarte, M. R. (2013) Portuguese lavenders: evaluation of their potential use for health and agricultural purposes. Tese de doutoramento. Universidade de Coimbra. Coimbra, Portugal.

V. FITOTOXICIDADE

1. Introdução

A infestação dos campos agrícolas por ervas daninhas (infestantes) reduz significativamente o rendimento e a qualidade das culturas, implicando elevados custos (Liebman *et al.*, 2000). Embora também se apliquem métodos de controlo mecânico, o uso de herbicidas sintéticos é uma prática globalmente aceite e vulgarizada como técnica de controlo e gestão de infestantes.

O uso intensivo e indevido destes produtos, visando o aumento do rendimento das culturas, representa riscos para o ambiente, bem como para a saúde humana e animal, e além disso, tem levado ao aumento da incidência do desenvolvimento de resistência das infestantes a herbicidas (Owen *et al.*, 2005). Os comprovados impactes negativos decorrentes desta prática, têm justificado a procura de agentes herbicidas alternativos menos tóxicos e, nesta senda, o potencial de produtos naturais derivados de plantas tem sido amplamente explorado, em particular os óleos essenciais pelas suas conhecidas propriedades alelopáticas (Martino *et al.*, 2010). Assim, por reunirem propriedades fitotóxicas, uma relativamente rápida degradação no ambiente, os óleos essenciais e seus compostos maioritários configuram-se como alternativas viáveis, com diversos estudos a comprovar os seus efeitos na inibição da germinação de sementes e do crescimento de espécies infestantes (Singh *et al.*, 2005; Salamci *et al.*, 2007; Verdeguer *et al.*, 2009).

Tendo em vista o estabelecimento e otimização de um protocolo simples para a avaliação do potencial herbicida de óleos essenciais, realizaram-se ensaios de fitotoxicidade de um composto maioritário dos óleos em estudo obtido comercialmente, o 1,8-cineol, usando uma linha celular de medula de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) BY-2.

2. Materiais e Métodos

Os ensaios de avaliação da toxicidade de 1,8-cineol em para células vegetais, foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

2.1. Composto puro

O 1,8-cineol (Merck) utilizado tinha um grau de pureza superior a 95%. As diluições prepararam-se em DMSO [sem nunca exceder a concentração de 2% (v/v)], momentos antes da sua utilização, a partir do concentrado armazenado a 4°C.

2.2. Linha celular e condições de cultura

O calo de medula de tabaco, linha celular BY-2, foi cultivado em condições de esterilidade em tubos de ensaio contendo meio MS suplementado com 1 mg L^{-1} de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), com adição de 6 g L^{-1} e pH ajustado a 5,6-5,8. O calo foi mantido em estufa, no escuro, a $24 \pm 1^\circ\text{C}$, e repicado a cada 4 semanas.

Para a realização dos ensaios, obteve-se uma suspensão celular por transferência de um volume equivalente de calo para Erlenmeyers estéreis de 50 ml, contendo 15 ml de meio de cultura líquido, incubados com agitação (80 rpm), a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, com monitorização constante do volume de meio disponível. Após 3 semanas, selecionaram-se duas réplicas da suspensão celular e homogeneizaram-se para a obtenção de uma suspensão inicial de células, a partir da qual se realizaram os ensaios.

2.3. Inibição da proliferação de células vegetais

O efeito de diferentes concentrações de 1,8-cineol na proliferação de células de tabaco foi determinado por quantificação do peso de um volume equivalente de suspensão celular após 3 semanas de tratamento.

Transferiu-se 1 ml de suspensão inicial para cada um dos Erlenmeyers de 50 ml contendo o meio de cultura líquido acima descrito, e aplicaram-se os tratamentos, num intervalo de concentrações de teste entre 0,16 e $20\text{ }\mu\text{L mL}^{-1}$, incluindo-se um controlo de crescimento de apenas células e meio, e um controlo contendo DMSO na concentração de 1 e 2% (v/v). Para todas as condições testadas realizaram-se 5 réplicas.

As suspensões celulares foram mantidas em cultura numa incubadora com agitação (80 rpm), a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, devidamente fechadas e protegidas da luz, durante cerca de 3 semanas. Seguidamente, retirou-se 1 ml de suspensão de cada uma das réplicas para eppendorfs, de massa previamente determinada, centrifugaram-se a 10,000 rpm, durante 6 minutos, e desperdiçaram-se os sobrenadantes por aspiração com pipeta micrométrica. Determinou-se a massa de cada uma das réplicas usando uma balança de precisão.

2.4. Análise estatística

Os resultados são apresentados como média \pm SEM (erro padrão da média) de um ensaio com 5 réplicas.

O tratamento estatístico dos dados foi realizado usando o GraphPad Prism versão 5.02. Realizou-se uma análise de variância de uma via (ANOVA) com pós-teste de Dunnett's, a fim de detetar a existência de diferenças significativas entre os tratamentos com diferentes concentrações de 1,8-cineol e o controlo de células mantidas em meio de cultura (níveis de significância: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Com a realização de um test-t, verificou-se a existência de diferenças significativas entre o tratamento das células apenas com DMSO e o controlo, bem como entre os diferentes tratamentos, nas situações em que esta análise se demonstrou relevante (níveis de significância: # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$).

3. Resultados

3.1. Inibição da proliferação de células vegetais

Os resultados obtidos (Figs. 14 e 15) demonstraram que 1,8-cineol inibiu significativamente ($p < 0,001$) a proliferação das células de tabaco em suspensão a todas as concentrações testadas ($0,16 \mu\text{L mL}^{-1}$; $0,32 \mu\text{L mL}^{-1}$; $5 \mu\text{L mL}^{-1}$ e $20 \mu\text{L mL}^{-1}$), quando comparado com o controlo de células mantidas apenas em meio de cultura. A percentagem de proliferação das células nunca excedeu os 50% e nas concentrações de 5 e $20 \mu\text{L mL}^{-1}$ foi marcadamente mais baixa, cerca de 7%.

Relativamente ao controlo com DMSO na concentração de 1% (v/v), a proliferação celular excedeu o controlo, embora de forma não significativa.

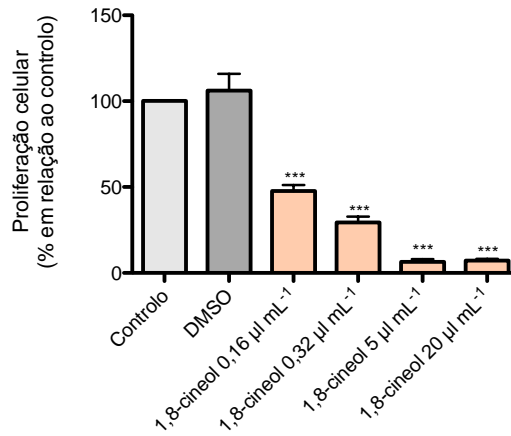


Figura 14. Efeito das diferentes concentrações de 1,8-cineol na proliferação de células de tabaco (BY-2). As células foram mantidas durante 3 semanas em suspensão contendo meio de cultura (controlo), ou DMSO a 1% (v/v), ou na presença das diferentes concentrações de 1,8-cineol (0,16-20 µL mL⁻¹). Os resultados são expressos como percentagem de proliferação das células na presença de 1,8-cineol (***) p<0,001, em relação ao controlo) Cada valor corresponde à média ± SEM de um ensaio com 5 réplicas.



Figura 15. Aspetto das culturas nos diferentes tratamentos aplicados.

4. Discussão

No presente estudo, foi avaliada a atividade do 1,8-cineol como inibidor da proliferação de células de tabaco, linha celular BY-2, mantidas em suspensão em meio MS, suplementado com 2,4-D na concentração de 1mg L^{-1} . O 1,8-cineol revelou-se efetivo, ocorrendo inibição da proliferação celular de uma forma dose-dependente.

De referir ainda que, a contaminação das réplicas referentes ao DMSO na sua concentração máxima [2% (v/v)] impossibilitou a leitura dos resultados. O facto de existir um ligeiro aumento da percentagem de proliferação a metade da concentração máxima a que o DMSO está presente, embora não significativo em relação ao controlo, sugere a necessidade da realização de novos ensaios com a aplicação da concentração de 2% (v/v) para esclarecer a influência do DMSO na promoção da proliferação celular. Sabe-se porém, que a interpretação dos restantes resultados não fica comprometida pela falta deste dado, porque o alvo de estudo é um antagonista da proliferação celular.

Os resultados que aqui se apresentam são corroborados pelo estudo de Yoshimura *et al.* (2011), que demonstram atividade semelhante do 1,8-cineol na inibição da proliferação de células BY-2 em meio MS suplementado com 2,4-D. O referido estudo, esclarece ainda que a parede celular não afeta a permeabilidade das células ao 1,8-cineol, uma vez que não se verificaram diferenças entre os resultados obtidos nos ensaios usando protoplastos (sem parede celular).

A fitotoxicidade do 1,8-cineol tem sido reportada por estudos que evidenciam os seus efeitos na inibição do crescimento da raiz e diminuição das taxas de germinação de sementes de plantas herbáceas (*Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv. e *Cassia obtusifolia* L.) (Romagni *et al.*, 2000), no metabolismo de mitocôndrias isoladas de *Zea mays* L. e no crescimento das suas raízes primárias, sem afetar a taxa de germinação de sementes (Abrahim *et al.*, 2000). Zuzino & Zygodlo (2004) demonstram, para a mesma espécie, a atividade do 1,8-cineol na inibição do crescimento de raízes por indução de stress oxidativo.

Por se tratar de um estudo que teve como objetivo primordial o desenvolvimento de um protocolo adequado para a avaliação da toxicidade de óleos essenciais e seus compostos maioritários em células vegetais, os resultados obtidos não permitem inferir sobre o potencial do 1,8-cineol como alternativa aos herbicidas sintéticos. No entanto, em certa medida, vêm reforçar a utilidade do modelo *in vitro* de suspensão de células de tabaco para a realização de estudos de fitotoxicidade, pela

obtenção de resultados concordantes com estudos posteriores, através de uma metodologia simplificada.

5. Bibliografia

- Abraham, D., Braguini, W. L., Kelmer-Bracht, A. M., & Ishii-Iwamoto, E. L. (2000). Effects of four monoterpenes on germination, primary root growth, and mitochondrial respiration of maize. *Journal of Chemical Ecology*, 26(3), 611-624.
- Liebman, M., & Davis, A. S. (2000). Integration of soil, crop and weed management in low-external-input farming systems. *Weed Research-Oxford*, 40(1), 27-48.
- Martino L., Mancini, E., Rolim de Almeida, L.F., Feo, V. (2010). The germinative activity of Twenty-Seven Monoterpenes. *Molecules*, 15, 6630-6637
- Nagata, T., Nemoto, Y., & Hasezawa, S. (1992). Tobacco BY-2 cell line as the “HeLa” cell in the cell biology of higher plants. *International Review of Cytology*, 132, 1-30.
- Singh, H. P., Batish, D. R., Setia, N., & Kohli, R. K. (2005). Herbicidal activity of volatile oils from *Eucalyptus citriodora* against *Parthenium hysterophorus*. *Annals of applied biology*, 146(1), 89-94.
- Owen, M. D., & Zelaya, I. A. (2005). Herbicide-resistant crops and weed resistance to herbicides. *Pest Management Science*, 61(3), 301-311.
- Salamci, E., Kordali, S., Kotan, R., Cakir, A., & Kaya, Y. (2007). Chemical compositions, antimicrobial and herbicidal effects of essential oils isolated from Turkish *Tanacetum aucheranum* and *Tanacetum chiliophyllum* var. *chiliophyllum*. *Biochemical systematics and ecology*, 35(9), 569-581.
- Romagni, J. G., Allen, S. N., & Dayan, F. E. (2000). Allelopathic effects of volatile cineoles on two weedy plant species. *Journal of Chemical Ecology*, 26(1), 303-313.

- Verdeguer, M., Blázquez, M. A., & Boira, H. (2009). Phytotoxic effects of *Lantana camara*, *Eucalyptus camaldulensis* and *Eriocephalus africanus* essential oils in weeds of Mediterranean summer crops. *Biochemical Systematics and Ecology*, 37(4), 362-369.
- Yoshimura, H., Sawai, Y., Tamotsu, S., & Sakai, A. (2011). 1, 8-cineole inhibits both proliferation and elongation of BY-2 cultured tobacco cells. *Journal of chemical ecology*, 37(3), 320-328.
- Zunino, M. P., & Zygadlo, J. A. (2004). Effect of monoterpenes on lipid oxidation in maize. *Planta*, 219(2), 303-309.

VI. CONCLUSÕES

E

PERSPECTIVAS FUTURAS

1. Conclusões e Perspectivas Futuras

No presente estudo, desenvolveram-se ensaios *in vitro* de determinação da atividade antifúngica, anti-inflamatória e citotoxicidade para células humanas e animais dos óleos essenciais de *Thymus albicans* e *Thymus lotocephalus*, visando essencialmente a procura de agentes alternativos ou complementares seguros para a terapia de doenças que têm vindo a afetar severamente a população mundial, como são as infeções fúngicas e as patologias de natureza inflamatória, para o tratamento das quais os fármacos convencionais se têm demonstrado ineficazes e pouco seguros, bem como abordagens reducionistas para doenças que se configuram de natureza multifatorial e poligénica.

Os óleos essenciais em estudo demonstraram ter uma atividade antifúngica de largo espectro, com eficácia contra todas as estirpes de *Candida*, *Cryptococcus neoformans*, dermatófitos e *Aspergillus* testadas, onde se incluem estirpes que infetam humanos, animais e contaminantes de alimentos. Ensaios de elucidação do mecanismo de ação em *Candida albicans*, principal agente etiológico das candidíases, permitiram determinar a ação dos óleos essenciais na inibição da atividade de enzimas mitocondrias e formação do tubo germinativo, este último, um importante fator de virulência, cuja inibição é relevante para impedir a disseminação da candidíase.

O potencial anti-inflamatório dos óleos foi também avaliado num modelo *in vitro* de macrófagos de ratinho estimulados com lipopolissacarídeo bacteriano. O óleo essencial de *Thymus albicans* inibiu a produção de óxido nítrico, sendo este potencial anti-inflamatório justificado pela inibição seletiva da expressão da proteína iNOS.

Tendo em conta o potencial demonstrado pelo óleo essencial de *T. albicans* para uma futura aplicação em humanos e/ou animais, avaliou-se o seu perfil de segurança em diferentes linhas celulares (queratinócitos, macrófagos e hepatócitos) de forma a mimetizar as principais vias de administração dos óleos. As concentrações ativas e seguras foram determinadas e, particularmente, o óleo essencial de *Thymus albicans* mostrou ser um óleo bastante seguro, não tendo revelado toxicidade para as linhas celulares estudadas a concentrações em que: é fungicida para dermatófitos ($0,16 \mu\text{L mL}^{-1}$); é capaz de inibir a formação do tubo germinativo ($0,16$ e $0,32 \mu\text{L mL}^{-1}$), um importante fator de virulência cuja inibição é relevante para o tratamento de candidíases invasivas, e para as quais apresenta atividade anti-inflamatória ($0,32$ e $0,64 \mu\text{L mL}^{-1}$).

O óleo essencial de *Thymus albicans*, devido ao seu rendimento (2,4 %), potencial antifúngico e anti-inflamatório, bem como ao amplo perfil de segurança, configura-se como uma espécie de interesse industrial para futura comercialização. Tendo apresentado características bioativas, nomeadamente quanto à atividade antifúngica, mais relevantes do que o óleo essencial de *Thymus mastichina*, uma espécie pertencente à mesma secção botânica, que se encontra entre as espécies de tomilhos com maior relevância industrial, essencialmente devido ao seu óleo essencial.

Tomando em consideração o excelente potencial demonstrado pelo óleo essencial de *T. albicans*, é pertinente a continuação do seu estudo, visando o desenvolvimento de um cosmeceútico ou nutracêutico para complemento terapêutico em infeções fúngicas e doenças de cariz inflamatório. A realização de ensaios usando os seus compostos isolados ou frações enriquecidas em determinados constituintes do seu óleo essencial, devem ser consideradas para identificar frações mais ativas e compostos responsáveis pela sua atividade, bem como ensaios de elucidação de outros possíveis mecanismo de ação.

Com o intuito de amplificar o estudo sobre o potencial bioativo destes óleos essenciais, bem como de outros, realizaram-se ensaios de avaliação da fitotoxicidade numa linha celular de medula de tabaco (BY-2), usando um dos compostos maioritários dos óleos em estudo, o 1,8-cineol.

Foi possível estabelecer um protocolo simples e adequado que permitirá, entre outras aplicações possíveis, avaliar a atividade herbicida de óleos essenciais e seus compostos maioritários. Para o seu estabelecimento como bioherbicidas com aplicação no controlo de espécies infestantes, além da avaliação da fitotoxicidade, devem incluir-se ensaios de avaliação da sua toxicidade para espécies vegetais não-alvo, bem como, ensaios de determinação do seu mecanismo de ação, bioacumulação e toxicidade para humanos e animais.