



Leisa Nélda Pinto Évora

# Actividades biológicas e citotoxicidade do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L.

Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar, orientada pelo Professora Doutora Maria Teresa Cruz Rosete e coorientada pelo Professora Doutora Lígia Salgueiro Couto e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Leisa Nélide Pinto Évora

Actividades biológicas e citotoxicidade do óleo essencial de  
*Rosmarinus officinalis* L.

Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar, orientada pelo Professora Doutora Maria Teresa Cruz Rosete  
e coorientada pelo Professora Doutora Lígia Salgueiro Couto e apresentada à  
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Capa: *Rosmarinus officinalis* L. (Adaptada de flora-on.pt)



## **Agradecimentos**

À Professora Doutora Lígia Salgueiro e a Professora Doutora Maria Tereza Cruz pela orientação científica e pela oportunidade de trabalhar no Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra (CNC) e na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. Pela paciência e por estarem sempre disponíveis sempre que precisei.

À Dra. Célia Cabral (Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra) pela orientação durante a realização da atividade anti-inflamatória, antioxidante e citotoxicidade celular, um muito obrigada pela paciência e pelo incentivo. Pela boa vontade com que sempre me ajudou.

À Professora Doutora Maria José (Laboratório de Farmacognosia e Fitoquímica da Universidade de Coimbra) pela orientação e pela paciência com que me ajudou durante a realização da atividade antimicrobiana.

À Isabel Ferreira por tudo que me ensinou sobre a cultura de células e por estar sempre disponível quando precisei.

À Cátia Sousa um especial obrigada pela ajuda dada durante a realização do trabalho experimental e pela boa vontade com que sempre me ajudou.

Aos meus colegas de trabalho do CNC (João Ferreira, João Martins, Joana Liberal) por estarem sempre disponíveis a me ajudar em tudo o que precisei.

À Fátima e ao Gustavo por mostrarem sempre disponíveis em me ajudar durante a realização da atividade antioxidante.

Ao meu colega Jorge por todo o apoio dado durante a realização da atividade antimicrobiana.

Ao Edson Santos e Edmilson Semedo por todo apoio dado ao longo de todo o Mestrado.

Aos meus amigos (Artemisa Furtado, Joceline Almeida, Évina Pereira, Sofia Marques, Svitlana, Catarina Silva, Filipa Rainho e Babia Issouf) por todo o incentivo e apoio dado ao longo da realização do presente trabalho.



***Aos meus pais***

***Aos meus tios***

***Ao meu irmão***





# Índice

<b>Índice</b> .....	<b>vii</b>
<b>Índice de figuras</b> .....	<b>ix</b>
<b>Índice de tabelas</b> .....	<b>ix</b>
<b>Lista de abreviaturas</b> .....	<b>xi</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>xiii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>xvii</b>
<b>I- Introdução</b> .....	<b>I</b>
1. Plantas aromáticas e medicinais .....	3
2. Óleos essenciais .....	4
2.1. Características gerais .....	4
2.2. Composição química .....	5
2.3. Fatores que influenciam a variabilidade química dos óleos essenciais .....	5
2.4. Processos extrativos .....	6
2.5. Relevância económica .....	8
2.6. Atividades biológicas .....	9
2.6.1. Atividade antimicrobiana.....	10
2.6.2. Atividade anti-inflamatória.....	12
2.6.3. Atividade antioxidante.....	13
3. <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	14
3.1. Composição do óleo essencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	17
3.2. Atividades biológicas .....	19
4. Objetivos.....	21
<b>II- Materiais e Métodos</b> .....	<b>23</b>
1. Materiais e Métodos.....	25
1.1. Material vegetal.....	25
1.2. Análise do óleo essencial .....	25
2. Atividade antimicrobiana .....	26
2.1. Estirpes fúngicas testadas .....	26
2.1.1. Atividade antifúngica .....	27
2.1.2. Inibição do tubo germinativo .....	28
2.2. Atividade antibacteriana .....	29
2.2.1. Estirpes bacterianas testadas.....	29

3.	Atividade anti-inflamatória.....	31
3.1.	Diluição do óleo essencial .....	31
3.2.	Cultura celular.....	31
3.3.	Produção de óxido nítrico (NO) .....	31
4.	Avaliação da citotoxicidade .....	32
4.1.	Culturas celulares .....	32
4.2.	Determinação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT.....	33
5.	Análise de dados .....	34
6.	Atividade antioxidante .....	34
<b>III-</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>37</b>
1.	Atividade antimicrobiana.....	39
1.1.	Atividade antifúngica .....	39
1.1.1.	Inibição do tubo germinativo .....	40
1.2.	Atividade antibacteriana .....	41
2.	Atividade anti-inflamatória.....	42
2.1.	Efeito do óleo essencial na produção de óxido nítrico induzida por LPS em macrófagos (Raw 264.7).....	42
3.	Avaliação da viabilidade celular.....	43
3.1.	Efeito do óleo essencial na viabilidade celular de macrófagos (Raw 264,7), na presença do LPS.....	43
3.2.	Efeito do óleo essencial na viabilidade de células do epitélio alveolar (A549) .....	44
3.3.	Efeito do óleo essencial na viabilidade celular de queratinócitos (HaCaT).....	45
3.4.	Efeito do óleo essencial na viabilidade celular de hepatócitos (Hep G2) .....	46
3.5.	Efeito do óleo essencial na viabilidade de células intestinais (Caco-2).....	47
4.	Atividade antioxidante.....	48
<b>IV-</b>	<b>Discussão e conclusões .....</b>	<b>49</b>
<b>V-</b>	<b>Trabalhos futuros .....</b>	<b>55</b>
<b>VI-</b>	<b>Referências bibliográficas .....</b>	<b>59</b>

## Índice de figuras

<b>Figura 1:</b> Hidrodestilação com aparelho tipo Clevenger. ....	8
<b>Figura 2:</b> <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	15
<b>Figura 3:</b> Ocorrência em Portugal de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	16
<b>Figura 4:</b> Efeito do óleo essencial de <i>R. officinalis</i> na inibição da produção de nitritos em macrófagos (Raw 264.7).....	42
<b>Figura 5:</b> Efeito do óleo essencial de <i>R. officinalis</i> na viabilidade celular de macrófagos (Raw 264,7) pelo ensaio do MTT. ....	43
<b>Figura 6:</b> Efeito do óleo essencial de <i>R. officinalis</i> na viabilidade de células do epitélio alveolar (A549) pelo ensaio de MTT.....	44
<b>Figura 7:</b> Efeito do óleo essencial de <i>R. officinalis</i> na viabilidade celular de queratinócitos (HaCaT) pelo ensaio de MTT.....	45
<b>Figura 8:</b> Efeito do óleo essencial de <i>R. officinalis</i> na viabilidade celular de hepatócitos (HepG2) pelo ensaio de MTT.....	46
<b>Figura 9:</b> Efeito do óleo essencial de <i>R. officinalis</i> na viabilidade de células intestinais humanas(Caco-2), pelo ensaio de MTT.....	47

## Índice de tabelas

<b>Tabela 1:</b> Resumo dos compostos maioritários presentes no óleo essencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	18
<b>Tabela 2:</b> Rendimento, compostos principais e proveniência do óleo essencial de <i>R. officinalis</i> L. ....	25
<b>Tabela 3:</b> Estirpes de leveduras e fungos filamentosos testadas e proveniências.....	26
<b>Tabela 4:</b> Atividade antifúngica (MIC e MLC) do óleo essencial de <i>R. officinalis</i> .....	39
<b>Tabela 5:</b> Percentagem de filamentação de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.....	40
<b>Tabela 6:</b> Atividade antibacteriana (MIC e MLC) do óleo essencial de <i>R. officinalis</i> .....	41
<b>Tabela 7:</b> Atividade antioxidante (%) do óleo essencial de <i>R. officinalis</i> .....	48



## Lista de abreviaturas

ABAP - 2,2-azobis-(2-amidinopropano)

BHA - hidroxianizol butilado

BHT - hidroxitolueno butilado

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CO<sub>2</sub> - dióxido de carbono

COX-2 - Ciclo-oxigenase-2

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO - dimetil sulfóxido

g - gramas

g/L - grama por litro

HCL - ácido clorídrico

H<sub>2</sub>O - água

H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> - ácido fosfórico

IL - interleucinas (IL- $\alpha$  e IL-6)

iNOS - isoforma indutível da sintase do óxido nítrico

IPQ/CT5 - Instituto Português da Qualidade – Comissão Técnica 5

ISO/TC54 - *International Standards Organization - Technical Committee 54*

LPS - lipopolissacarídeo

mg - miligrama

mL - mililitro

mm - milímetro

MIC - mínima concentração inibitória

MLC - mínima concentração letal

MHA - *Muller-Hinton Ágar*

MW 48 - microplaca de 48 poços

MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

NA - *Nutriente Agar*

NaOH - Hidróxido de sódio

NO - Óxido nítrico

NP - Norma Portuguesa

NYP - *N-acetilglucosamine, Yeast Nitrogen Base, Proline*

°C - Graus celsius

PBS - Tampão fosfato salino

PDA - Potato Dextrose Agar

PGE2 - Prostaglandina E2

R. - *Rosmarinus*

p/v - peso/volume

DAS - *Saboraud Dextrose Agar*

SDS - *Dodecil sulfato de Sódio*

TBA - Ácido tiobarbitúrico

TSA - *Tryptona Soya Agar*

TNF- $\alpha$  - Fator de necrose tumoral alfa

v/v - volume/volume

$\mu\text{g}$  - micrograma

$\mu\text{L}$  - microlitro

$\mu\text{m}$  - micrometro

## Resumo

O Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) é uma espécie aromática medicinal pertencente à família das Lamiaceae largamente reconhecida pela sua utilização em culinária e nas indústrias farmacêutica, alimentar e cosmética. Esta é uma planta perene adaptando-se adequadamente ao clima predominantemente Mediterrâneo de Portugal, sendo caracterizada por possuir teores elevados de óleos essenciais. Os óleos essenciais são compostos de baixo peso molecular, capazes de atravessarem a barreira hemato-encefálica, normalmente isentos de toxicidade e que apresentam diversas propriedades biológicas, como por exemplo, propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas.

Doenças causadas por microorganismos infecciosos, nomeadamente fungos e bactérias têm representado um sério risco para as populações em todo o mundo, principalmente devido ao fato de desenvolverem resistências aos antimicrobianos sintéticos. Por outro lado, a oxidação assim como a contaminação microbiana têm sido causas relevantes de deterioração dos alimentos, originando grandes perdas económicas e problemas de saúde pública. Desta forma, a procura de agentes antimicrobianos naturais tem suscitado grande interesse na comunidade médica e científica.

O stresse oxidativo associado a inflamação crónica foi recentemente reconhecido como um fator chave para as alterações fisiopatológicas observadas em uma ampla gama de doenças, tais como a disfunção cerebral, cancro, doenças cardiovasculares, doenças hepáticas e o declínio do sistema imunológico. Deste modo, moléculas detentoras de propriedades anti-inflamatórias e simultaneamente antioxidantes apresentam elevado potencial terapêutico no tratamento destas patologias.

Neste contexto, no presente trabalho pretende-se avaliar as potencialidades biológicas do óleo essencial de *R. Officinalis* oriundo de Portugal, sendo possível estudar as suas atividades antifúngicas, contra várias estirpes de leveduras e fungos filamentosos patogénicos para o homem e outros animais, incluindo a inibição do tubo germinativo em *Candida albicans*, um importante fator de virulência. Também a atividade antibacteriana contra estirpes de bactérias patogénicas de origem alimentar foi avaliada, tendo por base a mínima concentração inibitória (MIC) e a mínima concentração letal (MLC).

O potencial anti-inflamatório do óleo essencial de *R. officinalis* foi também avaliado num modelo *in vitro* representativo da inflamação periférica, utilizando a linha celular de macrófagos (Raw 264.7) estimulada com o agonista do recetor *Toll-like 4*, o lipopolissacarídeo (LPS). Na presença de produtos bacterianos, como o LPS, os macrófagos produzem mediadores pro-inflamatórios, nomeadamente o óxido nítrico (NO), responsável

pela amplificação da resposta inflamatória. Concomitantemente testou-se a citotoxicidade do óleo essencial na mesma linha celular na presença de LPS, bem como a sua citotoxicidade em diversas linhas celulares humanas do epitélio alveolar (A549), queratinócitos (HaCaT), hepatócitos (Hep G2) e intestinais (Caco-2), com o objetivo de identificar concentrações do óleo essencial bioativas e isentas de toxicidade.

Para o presente trabalho avaliou-se ainda a atividade antioxidante do óleo essencial pelo método de substância reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), na presença e na ausência de um indutor de peroxidação lipídica (ABAP).

Os ensaios da avaliação da atividade antifúngica mostraram que o *Cryptococcus neoformans* foi a levedura que apresentou maior sensibilidade ao óleo essencial com valores de MIC de 0,64 µL/mL. Os resultados da inibição do tubo germinativo em *Candida albicans*, um fator importante de patogenicidade na invasão de tecidos, demonstraram que o óleo essencial inibiu totalmente a formação do tubo germinativo na concentração de 0,64 µL/mL e na concentração de 0,08 µL/mL foi ainda observada uma elevada percentagem de inibição (63,2%) em comparação com as células não tratadas. O fato do óleo inibir a sua formação, torna-o um promissor agente antifúngico com potencial utilização na indústria farmacêutica.

Entre os fungos dermatofitos testados, o *Epidermophyton floccosum* foi o que apresentou maior sensibilidade ao óleo essencial com um MIC de 0,64 µL/mL, sendo esta concentração não citotóxica para os queratinócitos. Este fato evidencia a potencial aplicação tópica do óleo no tratamento de infecções causadas por dermatófitos.

Com base nos valores de MIC obtido, verificou-se que, a *Listeria monocytogenes* e a *Staphylococcus aureus* foram as estirpes mais sensíveis ao óleo essencial com um MIC de 2,5 µL/mL.

O estudo da atividade anti-inflamatória do óleo, avaliada pela inibição da produção do NO, demonstrou que o mesmo não apresenta bioatividade quando testado em concentrações não tóxicas. O óleo essencial demonstrou ainda ausência de toxicidade para a maioria das células estudadas quando utilizado em concentrações iguais ou inferiores a 0,64 µL/mL. Na linha celular de intestino humano o óleo essencial não apresentou citotoxicidade significativa para concentrações inferiores a 0,32 µL/mL.

Relativamente à avaliação da atividade antioxidante, o óleo essencial demonstrou inibição significativa da peroxidação lipídica na ausência do indutor (ABAP).

Em síntese, o presente trabalho permite concluir que o óleo essencial de *R. officinalis* apresenta potencial terapêutico como fungicida no tratamento tópico de dermatofitoses, quando utilizada em concentrações não superiores a 0,64 µL/mL. Adicionalmente o óleo



essencial poderá ser utilizado como um antioxidante natural na preservação dos alimentos, sendo a sua aplicação por via oral segura para concentrações inferiores a 0,32 µL/mL.

**Palavras chave:** *Rosmarinus officinalis*, óleo essencial, atividade antimicrobiana, atividade anti-inflamatória e atividade antioxidante.



## Abstract

The Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) is a medicinal aromatic plant of the Lamiaceae family widely recognized for its use in cooking and in the pharmaceutical, food and cosmetic industries. This is a adequately perennial adapted species to the mediterranean climate of Portugal, being characterized by having a high content of essential oils. Essential oils are low molecular weight compounds capable of crossing the blood-brain barrier generally free of toxicity and which have different biological properties such as antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial.

Diseases caused by infectious microorganisms, including fungi and bacteria represents a serious risk to populations all over the world, mainly because of developing resistance to synthetic antimicrobials. Moreover, the oxidation as well as microbial contamination have been important causes of food spoilage, causing large economic loss and public health problems. Thus, the demand for natural antimicrobials has aroused great interest in the medical and scientific community.

Oxidative stress associated with chronic inflammation has recently been recognized as a key factor in the pathophysiologic changes seen in a wide range of diseases such as cerebral dysfunction, cancer, cardiovascular disease, liver disease and decline of the immune system. In this case molecules possessing anti-inflammatory properties and antioxidant simultaneously have a high therapeutic potential in the treatment of these pathologies.

It was intended with this work to evaluate the biological potential of essential oils derived from *R. officinalis* coming from Portugal and also study its antifungal activity against various strains of yeast and filamentous fungi, both pathogenic to humans and other animals, including inhibition of germ tube in *Candida albicans*, an important virulence factor. Also the antibacterial activity against strains of food borne pathogenic bacteria was evaluated based on the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum lethal concentration (MLC).

The anti-inflammatory potential of the *R. officinalis* essential oil was also evaluated using an in vitro model representing a peripheral inflammation, using the macrophage cell line (RAW 264.7) stimulated with receptor agonist of Toll-like 4, lipopolysaccharide (LPS). In the presence of bacterial products such as LPS, the macrophages produce pro-inflammatory mediators including nitric oxide (NO), responsible for amplification of the inflammatory response. In parallel we tested the cytotoxicity of the essential oil in the same cell line and with the presence of LPS as well as their cytotoxicity in several human cell lines alveolar epithelial (A549), keratinocytes (HaCaT), hepatocytes (HepG2) and intestinal (Caco-2) with

the objective of identifying bioactive concentrations of the essential oil and free from toxicity.

Also with the present study we evaluated the antioxidant activity of the essential oil by the method of reactive substance of thiobarbituric acid (TBARS) in the presence and absence of an inducing lipid peroxidation (ABAP).

The tests on the evaluation of the antifungal activity showed that the *Cryptococcus neoformans* was the yeast that showed higher sensitivity to essential oil with MIC values of 0.64  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . The results of the inhibition of *Candida albicans* germ tube in a major pathogenic factor in tissue invasion, demonstrated that the essential oil completely inhibited germ tube formation in a concentration of 0.64  $\mu\text{L}/\text{mL}$  and the concentration of 0.08  $\mu\text{L}/\text{mL}$  was observed even a high percentage of inhibition (63.2%) compared to untreated cells. The fact that the oil inhibit its formation, makes it a promising antifungal agent with the potential use in the pharmaceutical industry.

Among the dermatophytes fungi tested, *Epidermophyton floccosum* was introduced more sensitive to the essential oil with a MIC of 0.64  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , which is non-cytotoxic concentration to keratinocytes. This fact highlights the potential oil topical application in the treatment of infections caused by dermatophytes.

Based on MIC values obtained, it was found that, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* strains were more sensitive to the essential oil with an MIC of 2.5  $\mu\text{L}/\text{mL}$ .

The study oil anti-inflammatory activity as assessed by inhibition of NO production, has demonstrated that it shows no bioactivity when tested at non-toxic concentrations. The essential oil also demonstrated the absence of toxicity to most cells studied when used in concentrations equal or inferior to 0.64  $\mu\text{L} / \text{mL}$ . In the human intestine cell line essential oil showed no significant cytotoxicity at concentrations below 0.32  $\mu\text{L} / \text{mL}$ .

Regarding the evaluation of antioxidant activity, the essential oil showed significant inhibition of lipid peroxidation in the absence of inducer (ABAP).

In summary, this study shows that the essential oil of *R. officinalis* has therapeutic potential as a fungicide in the topical treatment of dermatophytosis, when used in concentrations not exceeding the 0.64  $\mu\text{L} / \text{mL}$ . Additionally, the essential oil may be used as a natural antioxidant in food preservation, and their application for safe orally at less than 0.32  $\mu\text{L}/\text{mL}$ .

**Keywords:** *Rosmarinus officinalis*, essential oil, antimicrobial, anti-inflammatory and antioxidant activity.

## **I- Introdução**



## I. Plantas aromáticas e medicinais

Desde os primórdios da humanidade, o homem sempre dependeu do uso das plantas, ao utilizá-las como alimento, medicamento, na construção de abrigos, no aquecimento, entre outros. As crenças e ritos mágicos imperavam a par da utilização das plantas. Desde cedo, as plantas aromáticas foram associadas aos rituais sagrados, devido à intensificação do seu odor ao serem queimadas. Os primeiros habitantes do planeta queimavam plantas de odor agradável para pedir proteção aos bons deuses, sendo que as de aroma desagradável eram usadas para afugentar os animais, os inimigos e os deuses maléficos. Com o passar dos anos, as plantas aromáticas passaram a fazer parte das técnicas de prevenção e tratamento das doenças, de feridas e contusões (Cunha *et al.*, 2007).

Atualmente as plantas aromáticas e medicinais podem contribuir para a promoção da saúde humana devido às diversas atividades biológicas conferidas pelos seus metabolitos, às suas propriedades medicinais, sendo ainda muito utilizados como conservantes naturais (Bakkali *et al.*, 2008; Roby *et al.*, 2013; Cunha *et al.*, 2012; Dong *et al.*, 2015). Na indústria alimentar têm aplicação para dar sabor às carnes, saladas e sopas (Novak *et al.*, 2000) substituindo o sal adicionado aos alimentos (Costa *et al.*, 2015).

A demanda por plantas aromáticas tem vindo a aumentar tanto nos países industrializados como nos não industrializados também pelas suas propriedades antioxidantes naturais (Costa *et al.*, 2015), em substituição dos antioxidantes sintéticos utilizados na preservação dos alimentos (Ames, 1983; Baardseth, 1989; Zegura *et al.*, 2011).

Com os avanços da química de síntese novos medicamentos estão a ser desenvolvidos de forma eficaz, mas, mesmo assim, a utilização de plantas medicinais e produtos derivados tem vindo a aumentar globalmente, assim como o interesse científico nos seus constituintes (Essawi e Srour, 2000; Gachkar *et al.*, 2007).

São designadas plantas aromáticas e medicinais todas aquelas que elaboram e acumulam num ou mais dos seus órgãos óleos essenciais em quantidades significativas e que sejam usadas pelas suas propriedades medicinais (Buchbauer e Baser, 2010).

Os óleos essenciais são um exemplo de metabolitos produzidos com uma vasta utilização, sendo cada vez mais populares e atrativos do ponto de vista científico (Cunha *et al.*, 2012; Sadeghi *et al.*, 2013).

## 2. Óleos essenciais

### 2.1. Características gerais

Os óleos essenciais são metabolitos secundários de baixo peso molecular, voláteis e dotados de aroma (Burt, 2004; Llana-Ruiz-Cabello *et al.*, 2015; Cobellis *et al.*, 2015), motivo pelo qual são usualmente designados como compostos aromáticos. Esta designação não reflete a sua composição química pois a maioria integra compostos desprovidos de anel benzênico, principalmente compostos terpênicos (Buchbauer e Baser, 2010). São caracterizados pelo seu aspeto oleoso, por raramente serem coloridos e, normalmente, possuem uma densidade menor que a da água (Miguel, 2010).

Os óleos essenciais são os responsáveis pelas propriedades odoríferas características das plantas aromáticas (Cunha *et al.*, 2009) e muitas vezes responsáveis pelas suas propriedades medicinais (Llana-Ruiz-Cabello *et al.*, 2015).

Os óleos essenciais representam apenas uma pequena fração da composição da planta, no entanto, eles conferem as características pelas quais as plantas aromáticas são utilizadas nas indústrias alimentar, cosmética e farmacêutica (Eridis, 2007; Pourmortazavi e Hajimirsadeghi, 2007)

Quando os óleos essenciais e as plantas que os contêm possuem propriedades farmacológicas que justificam a sua inclusão nas farmacopeias, estes são designados por fármacos aromáticos (Cunha *et al.*, 2009).

Os óleos essenciais estão presentes em todo o reino vegetal, ocorrendo naturalmente nas plantas aromáticas. As principais famílias produtoras de óleos essenciais são as *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Geraniaceae*, *Lamiaceae*, *Pineaceae*, *Rutaceae*, e *Verbenaceae* (Antunes *et al.*, 2004; Figueiredo *et al.*, 2007). Encontram-se na maioria dos órgãos vegetais, nomeadamente, raízes, rizomas, caules, cascas, folhas, flores (frequentemente nas inflorescências), frutos e sementes, sendo produzidos em estruturas secretoras especializadas (internas e externas) (Burt, 2004; Bakkali *et al.*, 2008).

Nas últimas décadas tem havido o ressurgimento do uso da medicina popular em conjunto com a medicina moderna, por isso a procura de substâncias biologicamente ativas tem incentivado o uso de óleos essenciais, muitos deles com propriedades antimicrobianas, antioxidantes e anti-inflamatórios (Figueiredo *et al.*, 2008; Tavares *et al.*, 2010; Gonçalves *et al.*, 2012; Kim e Yun, 2013). Outras características atrativas dos óleos essenciais são o fato de serem produtos naturais e biodegradáveis, apresentarem baixa toxicidade para os mamíferos



e por desempenharem simultaneamente as funções de mais do que um dos seus equivalentes sintéticos (Figueiredo *et al.*, 2007).

## 2.2. Composição química

Vários são os compostos que intervêm na constituição dos óleos essenciais, sendo a vasta maioria de natureza terpénica (terpenos de baixo peso molecular) (Miguel, 2010; Bakkali *et al.*, 2008), como por exemplo o  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, 1,8-cineol, mentol, linalool, entre outras (Burt, 2004). Eles são o maior grupo de metabolitos secundários de origem vegetal e ocorrem na maioria das Gimnoespérmicas e em muitas famílias das Angiospérmicas (Cunha *et al.*, 2009). Estes compostos são formados por unidades isoprénicas, sendo mais frequentes nos óleos essenciais os monoterpenos, sesquiterpenos e menos frequentemente os diterpenos (Bakkali *et al.*, 2008; Buchbauer e Baser, 2010; Sinha *et al.*, 2014). A diversidade estrutural dos monoterpenos permite classifica-los em pelo menos quatro grupos: acíclicos, monocíclicos, bicíclicos e irregulares (Simões *et al.*, 1999). De igual modo, os sesquiterpenos podem ser classificados consoante a sua estrutura cíclica, acíclica ou bicíclica (Cunha *et al.*, 2009). Os fenilpropanóides são outro grupo de compostos de natureza fenólica, frequentes nos óleos essenciais de algumas famílias (Burt, 2004; Figueiredo *et al.*, 2008). Temos como exemplo o safrol e o anetol (Figueiredo *et al.*, 2008).

## 2.3. Fatores que influenciam a variabilidade química dos óleos essenciais

As principais diferenças que caracterizam os vários tipos de aroma nas plantas resultam de diferenças na volatilidade dos compostos voláteis e na quantidade de produtos químicos presentes nos óleos essenciais. A variabilidade química dos óleos essenciais é muito comum em plantas, considerando-se como uma consequência de diversos fatores que influenciam a biossíntese de compostos voláteis e que fundamentam a existência no mesmo *taxon*, de óleos essenciais com composições muito distintas. Esses fatores são de natureza diversa: alguns são intrínsecos (sexuais, sazonais, ontogénicos e genéticos) e outros extrínsecos (luz, solo, humidade, etc.) que influenciam a biossíntese dos óleos essenciais, conferindo-lhe uma elevada variabilidade química (Lahlou, 2004; Cunha *et al.*, 2009).

Fatores ambientais, nomeadamente meteorológicos ou edáficos, podem afetar, de diversos modos, a composição dos óleos essenciais, não sendo fácil generalizar os seus efeitos. Sabe-se, no entanto, que as condições climáticas afetam com maior incidência a composição dos óleos que são produzidos e acumulados em estruturas secretoras externas,

como os tricomas glandulares característicos de algumas espécies da família das Lamiaceae, relativamente aos óleos que se encontram em canais esquizogénicos/ lisigénicos, como nos frutos e raízes das Apiaceae (Cunha et al., 2009).

A insolação, a relação temperatura/humidade do ar e o tipo de solo, especialmente no que respeita à disponibilidade de água assimilável pelas plantas são os fatores edafoclimáticos que mais afetam a produção dos óleos essenciais (Cunha et al., 2009).

A composição dos óleos essenciais pode também ser determinado por fatores fisiológicos, motivo pelo qual, os óleos essenciais de composição muito distinta podem ser isolados de diferentes órgãos da mesma planta, como é o caso típico do *Citrus aurantium* subsp. *Aurantium* (Cunha et al., 2009).

Apesar de numa mesma população as plantas serem morfologicamente indiferenciadas e sexualmente compatíveis, alguns indivíduos podem produzir óleos essenciais com composições químicas distintas, diferenças quantitativas que resultam da expressão de vias metabólicas distintas, derivadas de pequenas diferenças genéticas. Deste modo, é possível distinguir categorias químicas intraespecíficas, denominados quimiotipos ou variedades químicas com interesses particulares nos diversos taxa (Salgueiro, 1994).

## 2.4. Processos extrativos

Os óleos essenciais são extraídos do material vegetal por destilação e no caso dos frutos do género *Citrus* por expressão (Cunha et al., 2009; Buchbauer e Baser, 2010). A expressão trata-se de um método físico de extração em que os óleos são extraídos do pericarpo dos frutos, por prensagem ou picotagem e arrastados pela água, seguindo-se, em ambos os casos, uma separação por centrifugação (Buchbauer e Baser, 2010).

De acordo com as normas da *International Standard Organization on Essential oils*, ISO 9235 (1997) da ISSO/ TC 54 e da Norma Portuguesa NP 90 (1987) do IPQ-CT 5, apenas são considerados óleos essenciais aqueles que são obtidos exclusivamente por estes processos, ou seja, por destilação, com ou sem vapor de água, ou por processos mecânicos (Cunha, et al., 2009).

A destilação é um processo simples, de baixo custo e que se revela vantajoso por apenas arrastar os compostos voláteis. Todas as técnicas utilizadas a nível industrial utilizam a água e/ ou o vapor de água para facilitar a libertação dos óleos essenciais das células ou das estruturas vegetais onde se acumulam (Cunha et al., 2009). Estas técnicas são distinguidas de acordo com o modo como a água e o vapor são utilizados. Podem considerar-se três tipos

de técnicas de destilação: a destilação em água, frequentemente designada como sendo uma hidrodestilação, a destilação em água com arrastamento de vapor e a destilação por arrastamento de vapor (Lourenço, 2007; Cunha *et al.*, 2009). As duas primeiras técnicas requerem destiladores mais simples, com apenas uma caldeira aquecida diretamente, sendo usadas nas indústrias mais pequenas. A destilação por arrastamento a vapor utiliza vapor de água a 0,3-0,4 kg/cm<sup>2</sup>, gerado num recipiente independente e depois introduzido no fundo de um alambique, no sentido ascendente. O processo de hidrodestilação consiste em ferver o material vegetal em água de modo a que o seu vapor possa ser condensado. O óleo que é imiscível com a água é separado. Neste processo de extração, o material vegetal está sempre em contacto direto com a água, enquanto na destilação por arrastamento a vapor, o material vegetal é colocado sobre uma grelha, sem contacto com a água (Buchbauer e Baser, 2010)

O equipamento descrito na Farmacopeia Portuguesa, utilizado para a dosagem dos óleos essenciais nas plantas aromáticas, é constituído por um balão de fundo redondo acoplado a um aparelho de Clavenger (Figura 1) (Farmacopeia Portuguesa, 2005).

Os extratos obtidos por recurso a diferentes solventes orgânicos, ou extração com fluido supercrítico (SFE) não devem ser considerados óleos essenciais (Cunha *et al.*, 2009; Lourenço, 2007; Cabral, 2013). No entanto, estes possuem na maior parte das vezes perfis de aroma quase idênticos à matéria-prima a partir da qual foram extraídos. Eles são portanto, muitas vezes utilizados nas indústrias de perfumes, cosmética e alimentar. No entanto, estes óleos só serão utilizados nas indústrias alimentares, se os solventes escolhidos forem aceites para utilização em alimentos, sem produzirem quaisquer resíduos prejudiciais nos produtos alimentares (Cabral, 2013). A sua utilização para fins alimentares está sujeita às regras de Segurança Alimentar, aplicáveis aos produtos alimentares e aos processos de controlo dessas regras de segurança. Deverão ser aplicados os princípios do sistema de análise do risco e pontos de controlo críticos (HACCP) (Cunha *et al.*, 2011).



**Figura 1:** Hidrodestilação com aparelho tipo Clevenger.

## 2.5. Relevância económica

A demanda por óleos essenciais provenientes de plantas aromáticas tem vindo a aumentar por todo o mundo e especula-se que movimentará cerca de 5 triliões de dólares até ao ano de 2050 (Verma *et al.*, 2014; Pandey e Singh, 2015).

O valor económico das plantas aromáticas reflete-se particularmente sobre os óleos essenciais deles obtidos. Muitos investigadores têm dado especial atenção a estes metabolitos e às suas propriedades farmacológicas, nomeadamente o seu mecanismo de ação em áreas diversificadas da saúde humana, como a prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares e diabetes ou como antibacteriano, antiviral ou antioxidante (Eridis, 2007).

Os óleos essenciais têm sido também largamente utilizados pelo seu aroma e sabor, com um vasto campo de aplicação na indústria farmacêutica, alimentar e em dermocosmética (Bakkali *et al.*, 2008; Cunha *et al.*, 2010).

Na indústria alimentar e de bebidas, os óleos essenciais tem vindo a ter diversas utilizações, como aditivos naturais para melhorar certas características dos alimentos. Atualmente e embora de uso restrito, os óleos essenciais são utilizados na indústria de alimentos compostos para animais, onde são incluídos como aromatizantes, contribuindo para a aceitabilidade do alimento composto, quer como modificadores de funções

fisiológicas. Na agricultura os óleos essenciais são utilizados, como repelentes de insetos, inseticidas ou moluscicidas. Na indústria farmacêutica são cada vez mais utilizados como adjuvantes corretivos de sabor e de odor em medicamentos para aplicação sobre a pele e mucosas (Zeng *et al.*, 2011; Cunha *et al.*, 2010).

O mercado das plantas aromáticas e dos óleos essenciais encontram-se fortemente enraizado na Europa e em crescimento nos restantes continentes. Estima-se que a produção mundial dos óleos essenciais seja superior a 42.000 toneladas, movimentando cerca de 45 biliões de euros anualmente, sendo que uma grande parte provém de plantas espontâneas (Figueiredo *et al.*, 2007). Assim, a cultura de plantas aromáticas e medicinais deve ser incentivada, bem como o financiamento de investigação das potenciais atividades biológicas dos seus óleos essenciais, por forma a serem obtidos produtos terapêuticos economicamente sustentáveis, naturais, biodegradáveis e não tóxicos.

## **2.6. Atividades biológicas**

As plantas aromáticas e medicinais, nomeadamente os seus óleos essenciais, apresentam inúmeras potencialidades, e são diversas as atividades biológicas que lhes são atribuídas, tais como: antimicrobianas, antioxidantes, antivirais, antiparasitárias, inseticidas, anti-inflamatórios, com elevado interesse para as indústrias alimentar, cosmética e farmacêutica (Figueiredo *et al.*, 2008; Miguel, 2010; Zuzarte *et al.*, 2011; Gonçalves *et al.*, 2012; Kim e Yun, 2013).

Os óleos essenciais aplicam-se a nível da saúde humana e animal, pelas suas propriedades com interesse terapêutico, resultantes da ação de algum dos seus diversos constituintes ou sinergismos entre vários deles, pelo que frequentemente a bioatividade dos óleos essenciais esta atribuída, não apenas a um componente, mas sim à ação combinada dos seus múltiplos constituintes (Cabral *et al.*, 2015).

O uso destas plantas, ou extratos dos mesmos tem vindo a ser utilizados em todo mundo na prevenção e tratamento de diversas patologias, nomeadamente doenças cardiovasculares, inflamatórias, intestinais, artrite, diabetes, alergias, esclerose múltipla e ainda doenças neurodegenerativas, como as doenças de Parkinson e Alzheimer (Juhás *et al.*, 2008). Com efeito, torna-se crucial investir na avaliação científica das suas atividades biológicas, toxicidade em humanos, bem como na identificação da sua composição química, com o objetivo destas plantas serem utilizadas de forma segura, tendo por base critérios de qualidade, eficácia e segurança.

### 2.6.1. Atividade antimicrobiana

As indústrias agroalimentares têm apostado na pesquisa de aditivos alimentares naturais, em especial os de origem vegetal que possam assegurar um tempo de conservação adequado às novas realidades do mercado global, bem como ir ao encontro das preocupações do consumidor atual (Gould, 2001). Isto justifica o grande interesse sobre a atividade dos óleos essenciais em sistemas alimentares, em particular em carnes e produtos cárneos (Burt, 2004). No entanto, com a alteração das técnicas de produção face à necessidade de um tempo de prateleira mais prolongado, surgiram os designados microrganismos emergentes e, conseqüentemente torna-se premente a procura de substâncias eficazes no seu controlo.

Doenças causadas por microrganismos infecciosas, nomeadamente fungos e bactérias patogénicas de origem alimentar tem representado um sério risco para as populações em todo o mundo, sendo responsáveis por um elevado número de mortes, este problema tornou-se mais preocupante ao longo dos anos devido a incidência e prevalência das doenças infecciosas por consequência da resistência dos microrganismos aos antibióticos convencionais (Nikaido *et al.*, 2009; Barreto *et al.*, 2014). Desta forma, a procura de compostos antimicrobianos naturais tem tido grande interesse a nível científico, pelo que as plantas aromáticas e medicinais representam um papel fulcral na procura de moléculas biologicamente ativas, contra diferentes microrganismos (Bassolé e Juliani, 2012). Neste contexto, a utilização de compostos naturais, como os óleos essenciais, apresenta-se como uma potencial ferramenta no entrave ao desenvolvimento de resistências.

De fato, a atividade antimicrobiana é uma das mais estudadas e reportadas para os óleos essenciais. Esta atividade está, geralmente, associada à presença de pequenas moléculas oxigenadas, capazes de estabelecer pontes de hidrogénio, exemplos do timol, carvacrol, eugenol, linalol e geraniol. Geralmente atuam por modificações da membrana externa dos microrganismos e por inibição de enzimas da cadeia respiratória, comprometendo o equilíbrio energético da célula (Lindley, 1998; Zeng *et al.*, 2011; Cunha *et al.*, 2012). O maior problema das leveduras e os fungos filamentosos, em termos de segurança alimentar é que podem produzir toxinas que, quando presentes nos alimentos, mesmo em pequenas quantidades podem causar quadros patológicos muito graves podendo comprometer a vida do consumidor (Lopez-Malo, 2002). De entre as micotoxinas, a contaminação por aflatoxinas de produtos alimentares tem sido a área de impulso de pesquisa nas últimas duas a três décadas, devido ao seu potencial genotóxico e carcinogénico (Anonymus, 1993; Passone, Girardie Etcheverry, 2013). As aflatoxinas são produtos do metabolismo

secundário de estirpes de *Aspergillus*, que tem vindo a afetar de forma ampla campos agrícolas em áreas tropicais e subtropicais (Shukla, 2009; Prakash *et al.*, 2011, Mishra *et al.*, 2013). Estudos científicos têm enfatizado o potencial efeito dos óleos essenciais no combate a esta problemática, uma vez que as aflatoxinas não são degradadas durante o processo de cozimento e devido a sua bioacumulação na cadeia alimentar, são consideradas assassinas ocultas para o consumidor (Bennett e Klich, 2003; Rubert, Soler e Manes, 2012; Prakash *et al.*, 2014). Desta forma os óleos essenciais têm demonstrado grande utilidade para a indústria alimentar, evitando a biodegradação dos alimentos e permitindo o aumento do tempo de prateleira bem como o bem-estar e a saúde do consumidor, de forma eficaz, não tóxica e económica, apresentando-se como uma boa alternativa aos antifúngicos sintéticos.

As infeções fúngicas têm vindo a aumentar nos últimos anos, e sendo normalmente recorrentes e recalcitrantes, constituem uma importante causa de morbidade, especialmente em pacientes de alto risco imunocomprometidos de alto risco (desnutridos, transplantados ou imunodeprimidos) (Pina-Vaz *et al.*, 2004; Pinto *et al.*, 2006, Figueiredo *et al.*, 2008). As micoses, doença infecciosa causada por fungos, podem ser classificadas em superficiais, que incluem micoses cutâneas como candidíases e dermatofitoses, e profundas, podendo ser sistémicas, subcutâneas ou oportunistas como a criptococose, aspergilose e candidíase sistémica (Brooks *et al.*, 2012). A anfotericina B e o fluconazol (antifúngicos sintéticos) têm sido os fármacos de primeira escolha terapêutica (Bergold e Giorgiadis, 2004), no entanto para além da resistência dos fungos, ambos os fármacos apresentam alguns efeitos colaterais, principalmente quando administrados concomitantemente com outros fármacos. Por estas razões a indústria farmacêutica tem investido na pesquisa de novos compostos terapêuticos, eficazes e que apresentam baixa toxicidade para os pacientes (Anaissie *et al.*, 1996; Osman e Abulrahman, 2003; Barreto *et al.*, 2014).

De acordo com Reichling *et al.* (2009) que compilou resultados importantes sobre as propriedades antibacterianas e antivirais dos óleos essenciais, relatou que estes demonstraram ser eficazes contra bactérias do trato respiratório. Além disso, os óleos essenciais demonstraram ser eficientes na inibição do crescimento e redução do número de outras bactérias altamente patogénicas, tais como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli* O157:H7 (Burt, 2004).

## 2.6.2. Atividade anti-inflamatória

A inflamação é um processo imunológico complexo através da qual o hospedeiro combate processos infecciosos induzidos por bactérias, vírus e outros agentes patogénicos (Costa *et al.*, 2012). De acordo com a intensidade, natureza e duração do estímulo lesivo, bem como da duração ou tempo de evolução do processo inflamatório, podem definir-se dois padrões de resposta inflamatória: aguda e a crónica. A inflamação aguda consiste numa fase inicial da resposta inflamatória, benéfica para o hospedeiro e mediada pela ativação das células do sistema imunológico (Sherwood e Toliver-Kisky, 2004; Costa *et al.*, 2012). Este tipo de inflamação persiste apenas por um curto período de tempo (dias) e é caracterizado por vasodilatação (assinalado clinicamente por vermelhidão e ardor no local da lesão), exsudação de proteínas e fluídos do plasma com a participação predominante de células fagocíticas (principalmente neutrófilos e macrófagos) (Francisco *et al.*, 2011). O processo de vasodilatação é mediado principalmente pelo óxido nítrico (NO) e prostaglandinas vasodilatadoras (Sherwood e Toliver-Kisky, 2004). Se a inflamação persistir por um longo período de tempo (dias ou meses a anos), ocorre a segunda fase da inflamação ou inflamação crónica. Os mediadores pró-inflamatórios produzem e ativam a cascata de transdução de sinal, nomeadamente fatores de transcrição, que controlam a expressão de genes que codificam proteínas inflamatórias, nomeadamente a ciclo-oxigenase-2 (COX-2), a isoforma indutível da sintase do óxido nítrico (iNOS) responsável pela produção de NO, citocinas inflamatórias e quimiocinas. Este ambiente inflamatório/oxidativo leva a um círculo vicioso, que quando sustentado durante um longo período de tempo, predispõe o hospedeiro para várias doenças inflamatórias crónicas, tais como, artrite reumatoide, lúpus, arteriosclerose, doenças neurodegenerativas e doenças inflamatórias intestinais (Sherwood e Toliver-Kisky, 2004) e cancro (Francisco *et al.*, 2011).

Os macrófagos são as principais células da imunidade inata e desempenham um papel fundamental nas respostas imunes de defesa do hospedeiro contra agentes patogénicos (Ohnishi *et al.*, 2011). A ativação dos macrófagos com estímulos inflamatórios, como endotoxinas bacterianas (LPS), resulta na libertação de vários mediadores pró-inflamatórios, tais como prostaglandinas E2 (PGE2), óxido nítrico (NO), fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  e interleucinas (IL), de entre as quais se destacam a IL-1- $\beta$  e IL-6 (Zhu *et al.*, 2013). O NO é produzido durante os processos inflamatórios pela ação da sintase do óxido nítrico (NOS). São conhecidas 3 isoformas da sintase do óxido nítrico, a NOS endotelial (eNOS), NOS neuronal (nNOS) e a NOS indutível (iNOS). Estudos efetuados nas últimas décadas têm enfatizado o papel do óxido nítrico na inflamação (Stuer e Marleta, 1985), pelo que



moléculas capazes de inibir a produção de NO apresentam potencial atividade anti-inflamatória.

Neste contexto, as plantas medicinais e seus metabolitos são muito utilizados na medicina popular para o tratamento de diferentes condições inflamatórias (Silveira e Sá *et al.*, 2013). A título de exemplo referem-se os óleos essenciais de eucalipto, rosmaninho, lavanda, juntamente com outras plantas (pinho, cravo e mirra) que têm sido utilizados em formulações mistas com propriedades anti-inflamatórias (Darshan e Doreswamy, 2004).

### 2.6.3. Atividade antioxidante

Após a deterioração microbiana, a oxidação é a segunda maior causa de deterioração dos alimentos (Lindley, 1998; Zeng *et al.*, 2011). A degradação dos produtos alimentares durante o processamento, transporte e armazenamento dos alimentos está, muitas vezes relacionada com a produção de metabolitos tóxicos causados pela degradação oxidativa nos alimentos, causando grandes perdas económicas e constituindo, desta forma, um desafio para a indústria alimentar (Prakash *et al.*, 2012; Praskash *et al.*, 2014).

Deste modo, os antioxidantes têm sido amplamente utilizados como aditivos alimentares para proporcionar proteção contra a degradação oxidativa de alimentos pelos radicais livres. Desde os tempos antigos, diferentes tipos de especiarias têm sido utilizados em alimentos para melhorar o sabor e também pelas suas capacidades antioxidantes (Madsen e Bertelsen, 1995). O efeito antioxidante é o resultado da capacidade de inibir o início dos processos oxidativos causados pelos radicais livres, ou para interromper as reações em cadeia na propagação de um estado oxidativo (Madsen *et al.*, 1995).

Porém, alguns antioxidantes sintéticos utilizados no processamento de alimentos, tais como hidroxitolueno butilado (BHT) e hidroxianisole butilado (BHA) (Pin-Der e Gow-Chin 1997), apresentam efeitos secundários, nomeadamente efeitos carcinogénicos em organismos vivos (Ito *et al.*, 1982; Ames, 1983; Baardseth, 1989; Osman e Abdulrahman, 2003). Neste sentido, os óleos essenciais apresentam-se como uma alternativa de elevado valor na preservação de alimentos, pela inibição da peroxidação lipídica dos alimentos contra os efeitos tóxicos dos oxidantes (Maestri *et al.*, 2006, Cabral *et al.*, 2015) que provocam alterações deletérias, como a perda de sabor, cor, valor nutricional e também a formação de radicais livres tóxicos, que têm efeitos tóxicos na saúde do consumidor (Friedman, Henika e Mandrell, 2002; Praskash *et al.*, 2014). Neste sentido a atividade antioxidante é uma das atividades biológicas dos óleos essenciais com interesse particular.

O efeito antioxidante dos óleos essenciais apresenta também elevado interesse do ponto de vista da saúde humana. Estas moléculas são competentes na eliminação de radicais livres, desempenhando um papel crucial na prevenção de doenças associadas ao stresse oxidativo, tais como disfunção cerebral, cancro, doenças cardiovasculares, hepáticas e o declínio do sistema imunológico (Tanikawa e Torimura, 2006; Zhu *et al.*, 2012). De fato, evidências científicas têm sugerido que estas patologias podem resultar de danos celulares causados pelos radicais livres (Aruoma, 1998; Borneo *et al.*, 2009; Sosa *et al.*, 2013; Morales *et al.*, 2014). Neste contexto, o uso de antioxidantes naturais, nomeadamente óleos essenciais, constitui uma abordagem terapêutica promissora pela sua eficácia e segurança (Zhang, Sun e Wang, 2013).

### 3. *Rosmarinus officinalis*

A família das Lamiaceae (Labiatae) é composta por, aproximadamente, 180 géneros e 3500 espécies, de ampla distribuição nas regiões mediterrâneas, no Médio Oriente e nas montanhas tropicais (Judd *et al.*, 2002). Esta família integra numerosas espécies aromáticas com muito interesse na área agro-alimentar e com potencial medicinal, como é o exemplo do *Rosmarinus officinalis* L. (Wang *et al.*, 2008; Ribeiro-Santos *et al.*, 2015).

*Rosmarinus officinalis* L. de denominação vulgar Alecrim é uma planta aromática muito bem representada em Portugal, frequente no centro e sul (Figura 3). Para além de *R. officinalis*, também estão incluídos no géneroas espécies *R. eriocalyx*, *R. tomentosus*, *R. lavandulaceus* e *R. laxiflorus* (Ribeiro-Santos *et al.*, 2015). *R. officinalis* é a única que cresce naturalmente na região mediterrânica e é a espécie mais explorada devido a presença de óleos essenciais valiosos e de compostos fenólicos (Zaouali *et al.*, 2010). É um arbusto lenhoso (1,8 m de altura), muito ramificado que se desenvolve em terrenos secos, normalmente calcários da região mediterrânea, sendo muito cultivado como planta ornamental e melífera. É uma planta verde, com hastes lenhosas, folhas pequenas e finas (10-41(46) × 1-3 mm), opostas e lanceoladas. A parte inferior das folhas é de cor verde-acinzentado enquanto a superior é verde brilhante. As flores reúnem-se em espiguilhas terminais e são de cor violeta ou esbranquiçada (Figura 2) (Morales, Flora Ibérica).

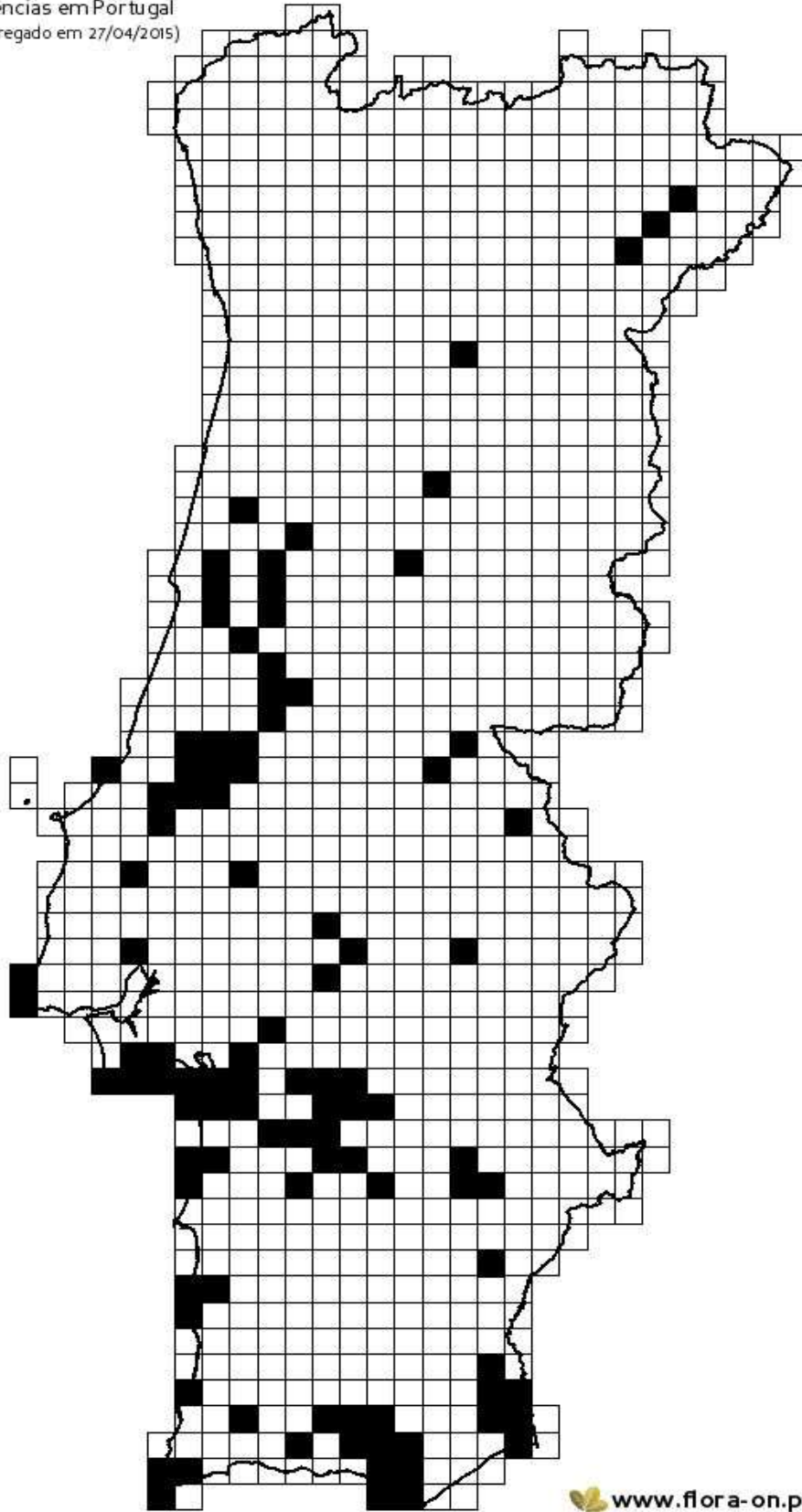


**Figura 2:** *Rosmarinus officinalis* L.

*Rosmarinus officinalis* L.

ocorrências em Portugal  
(descarregado em 27/04/2015)

Dados: M.Porto, A.Carapeto, F.Clamote, P.V.Araujo, A.J.Pereira, J.D.Almeida, E.Marabuto, S.Chozas, P.Pereira, U.Schwarzer, A.Clemente, C.Aguiar, V.Silva et al.  
A informação contida neste mapa é alvo de actualizações frequentes, podendo estar incompleta  
Quadricula UTM 10km Datum WGS84



 www.flora-on.pt

**Figura 3:** Ocorrência em Portugal de *Rosmarinus officinalis* L.

### 3.1. Composição do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis*

O *Rosmarinus officinalis* tem sido amplamente estudado pelos seus constituintes químicos, atualmente mais de duzentos compostos foram identificados, principalmente compostos voláteis e fenólicos. Os componentes químicos do óleo são maioritariamente monoterpenos e também sesquiterpenos (Jalali-Heravi *et al.*, 2011; Ojeda-Sana *et al.*, 2013). Destacam-se como constituintes maioritários os monoterpenos  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, canfeno, cânfora, borneol, acetato de bornilo e verbenona (Jiang *et al.*, 2011; Tavassoli *et al.*, 2011). *R. officinalis* contém altas percentagens de diterpenos fenólicos, triterpenos, ácidos fenólicos, e flavonoides (Sedighi *et al.*, 2015).

A composição química do óleo essencial de *R. officinalis* foi descrita por vários autores. Salido *et al.* (2003) verificou que as amostras provenientes do sul da Espanha eram maioritariamente constituídas por  $\alpha$ -pineno, 1,8-cineol e cânfora.

De acordo com Varela *et al.* (2009) que estudaram o polimorfismo químico de 87 populações espontâneas de *R. officinalis* na Espanha, verificaram que 38 delas apresentavam elevadas percentagens de 1,8- cineol (>24%) e que duas amostras apresentaram alto teor de verbenona (5,49 e 5,37 %).

Ainda estudos realizados com o óleo essencial das partes aéreas isolados em diferentes fases de desenvolvimento da planta demonstraram que o  $\alpha$ -pineno, cânfora, acetato de bornilo e 1,8-cineol são os componentes maioritários nas diferentes fases, respetivamente (Beretta *et al.*, 2011).

Estudos científicos evidenciaram que em diferentes zonas de Portugal a mesma espécie possui composição química distinta, por exemplo o óleo essencial de *R. officinalis* de zonas do Alentejo apresentam como compostos maioritários o mirceno, 1,8-cineol e cânfora (Serrano *et al.*, 2002), enquanto na Beira Interior os compostos maioritários identificados foram verbenona,  $\alpha$ -terpineol, cânfora, 4-terpineol e 1,8-cineol (Mata *et al.*, 2007).

Na Tabela I estão representados de forma resumida os principais trabalhos realizados sobre a composição química do óleo essencial de *R. officinalis*, destacando os compostos maioritários identificados. Numa mesma espécie são evidenciadas composições químicas diferentes, sobretudo a nível quantitativo.

**Tabela I:** Resumo dos compostos maioritários presentes no óleo essencial de *Rosmarinus officinalis*.

<b>Espécie</b>	<b>Origem</b>	<b>Compostos principais</b>	<b>Referências</b>
<i>R. officinalis</i>	Brasil	1,8-cineol (30,87%), cânfora (10.13%), $\alpha$ -pineno (9,79%) e $\beta$ -pineno (9,24 %).	Barreto et al., 2014
<i>R. officinalis</i>	Índia	(1,8-cineol (25,10%), cânfora 14.65%), cariofileno (6,08%), $\beta$ -Limoneno (5,78%) e $\beta$ -pineno (4.11%).	Kiran e Praskash, 2015
<i>R. officinalis</i>	China	1,8-cineol (27.23%), $\alpha$ -pineno (19,43 %), cânfora (14.26%) canfeno (11,52%) e $\beta$ -pineno (6.65 %).	Wang et al., 2008
<i>R. officinalis</i>	Espanha	verbenona (21,76%), cânfora (12,3 %), borneol (10,4%), 1,8-cineol (7,26 %), $\alpha$ -pineno (6,65%), $\beta$ -cariofileno (6,17%) e geraniol (5,75%).	Sachetti et al., 2005
<i>R. officinalis</i>	Irão	piperitona (23,7%), linalol (14,9%), $\alpha$ -pineno (14.4%) e 1,8-cineol (7,43%).	Gachkar et al., 2007
<i>R. officinalis</i>	Sérvia	1,8-cineol (43,77%), cânfora (12,53%), e $\alpha$ -pineno (11,51%).	Rašković et al., 2014
<i>R. officinalis</i>	China	1,8-cineol (26,54%), $\alpha$ -pineno (20,14%).	Jiang et al., 2011
<i>R. officinalis</i>	Itália	$\alpha$ -pineno (25,96-37,66%), cânfora (5,88-6,79%), acetato de bornilo (5,08-6,05%), 1,8-cineol (1,83-6,41%), $\beta$ -pineno (3,32-4,77%) e $\beta$ -mirceno (3,21-3,98%).	Bereta et al., 2011
<i>R. officinalis</i>	Alentejo (Portugal)	Mirceno (17,3-29,3%), cânfora (16,7-21,2%) 1,8-cineol (12,8-18,9%).	Serrano et al., 2002
<i>R. officinalis</i>	Beira Interior (Portugal)	Verbenona (35,4%), $\alpha$ -terpeniol (7,2%), cânfora (5,5%), 4-terpineol (3,9%) e 1,8-cineol (3,1%).	Mata et al., 2007
<i>R. officinalis</i> var <i>typicus</i>		1,8-cineol (47,2%) e cânfora (12,4%).	
<i>R. officinalis</i> var <i>trogodytorum</i>	Tunísia	1,8-cineol (27,51%) e cânfora (27,9%).	Zoauli et al., 2010

### 3.2. Atividades biológicas

*Rosmarinus officinalis* L. é uma planta aromática amplamente consumida em todo mundo, devidos às suas propriedades aromáticas e seus benefícios para a saúde humana. As suas folhas frescas e secas são frequentemente utilizadas na cozinha mediterrânea e na medicina tradicional como anti-inflamatórias, diuréticos, antimicrobianas e em cosmética (Holmes, 1999; Ribeiro-Santos *et al.*, 2015), bem como no tratamento de doenças neurodegenerativas (Bruckner *et al.*, 2014).

As atividades biológicas desta planta têm sido relacionadas com os seus compostos fenólicos e os seus constituintes voláteis (Babovic *et al.*, 2010; Teixeira *et al.*, 2013; Arranz *et al.*, 2015), tais como o carnasol, ácido carnósico e ácido rosmarínico presente nos extratos não voláteis, e o  $\alpha$ -pineno, acetato de bornilo, cânfora e 1,8-cineol presentes no óleo essencial desta planta (Babovic *et al.*, 2010; Arranz *et al.*, 2015; Teixeira *et al.*, 2013). Os constituintes menores podem também influenciar a sua atividade biológica devido à possibilidade de efeito sinérgico entre os seus constituintes (Hussain *et al.*, 2010).

O óleo essencial e os extratos de *R. officinalis* têm sido utilizados em embalagens na preservação de alimentos, na aromaterapia e na medicina humana (Holmes, 1999; Pedro, 2004; Peter, 2004; Yanishlieva *et al.*, 2006; Amaral *et al.*, 2013; Barreto *et al.*, 2014; Szumny, *et al.*, 2010). Além disso, alguns destes compostos são atualmente investigados relativamente às suas atividades anti-inflamatória, anticarcinogénica (Yanishlieva *et al.*, 2006; Ngo *et al.*, 2011) e quimiopreventiva (Okoh, Sadimenko e Afolayan, 2010).

Estudos científicos evidenciaram que o óleo essencial de *R. officinalis* tem maior atividade antimicrobiana contra várias bactérias (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*) e fungos (*Candida albicans* e *Aspergillus niger*) comparativamente com os seus compostos maioritários 1,8-cineol (26,54%) e  $\alpha$ -pineno (20,14%) (Jiang *et al.*, 2011). Com efeito é muito difícil atribuir o efeito antimicrobiano de um óleo essencial apenas aos seus compostos maioritários isolados, pelo que se pode inferir que a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *R. officinalis* resulta do efeito sinérgico dos seus constituintes (Jiang *et al.*, 2011). De fato, outros autores evidenciaram que a presença de 1,8-cineol como composto maioritário do óleo essencial diminuía consideravelmente a eficácia do óleo essencial contra o *Staphylococcus aureus*, enquanto a presença de  $\alpha$ -pineno como composto maioritário aumentava a sua eficácia. O mesmo efeito não foi observado contra *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*. Estes estudos enfatizam o fato da atividade antibacteriana do óleo essencial se

relacionar com a configuração química dos seus constituintes, com as proporções em que eles estão presentes e com as interações entre os mesmos (Jordán *et al.*, 2013).

A combinação do óleo essencial de *R. officinalis* L. com o óleo essencial de *Origanum vulgare* L. demonstrou ser eficaz na inibição de fungos patogênicos, nomeadamente *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger*, em uvas de mesa, preservando assim as suas qualidades físico-químicas durante o armazenamento (Sousa *et al.*, 2013). Nesse contexto, o óleo essencial de *R. officinalis* tem potencialidades antimicrobianas com aplicação nas indústrias alimentares.

A atividade antioxidante também é uma das atividades biológicas que têm sido reportadas tanto para o óleo essencial como para os seus compostos isolados. Evidências científicas concluíram que o óleo essencial de *R. officinalis* tem maior atividade antioxidante do que os seus compostos maioritários, nomeadamente 1,8-cineole,  $\alpha$ -pineno, e cânfora (Wang *et al.*, 2008).

De acordo com Rašković *et al.*, (2014) que estudou a atividade antioxidante do óleo essencial *in vitro* e *in vivo*, para além do óleo essencial ter potencial antioxidante *in vitro*, este é igualmente capaz de modular o estado oxidativo hepático pela ativação de mecanismos de defesa fisiológicos. Desta forma, o óleo essencial de *R. officinalis* é um antioxidante natural que poderá ser utilizado para tratar várias condições patológicas hepáticas. No entanto os resultados sobre a atividade antioxidante do óleo essencial de *R. officinalis* são por vezes difíceis de comparar, devido à ampla gama de ensaios de antioxidantes utilizados, com base em diferentes abordagens metodológicas e sem protocolos rigorosamente padronizados, e ainda pelo fato de o óleo essencial ter uma composição muito diversificada (Bereta *et al.*, 2011), o que dificulta qualquer tentativa de comparação direta da atividade antioxidante

Um estudo comparativo realizado com cinco plantas usadas como tempero na gastronomia portuguesa (*Foeniculum vulgare*, *Mentha spicata*, *Mentha pulegium*, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus serpyllum*) demonstrou que o óleo essencial de *R. officinalis* apresenta maior atividade na inibição da acetilcolinesterase (Mata, 2007). Este estudo evidencia as propriedades terapêuticas do óleo no tratamento de doenças degenerativas como a doença de Alzheimer.



## 4. Objetivos

Os principais objetivos do presente trabalho tiveram por base a avaliação da bioatividade do óleo essencial de *R. officinalis* de uso reconhecido na gastronomia portuguesa. Pretendeu-se avaliar o seu efeito antimicrobiano contra várias leveduras e fungos filamentosos e 3 estirpes de bactérias patogénicas de origem alimentar, nomeadamente *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* e *staphylococcus aureus*, com base em valores de MIC e MLC. O seu potencial efeito anti-inflamatório também foi avaliado, utilizando para o efeito um modelo *in vitro* realizado numa linha celular preponderante na resposta inflamatória periférica (macrófagos (Raw 264.7)) analisando simultaneamente a toxicidade celular. O perfil toxicológico do óleo essencial de *R. officinalis* ainda foi avaliado noutras linhas celulares humanas, nomeadamente células do epitélio alveolar (A549), queratinócitos (HaCaT), hepatócitos (Hep G2) e células do intestino (Caco-2), pelo ensaio de MTT.

Este trabalho também teve por objetivo avaliar o potencial antioxidante do óleo essencial na presença e na ausência de um indutor de peroxidação lipídica (ABAP), pelo ensaio de TBARS.

A realização deste trabalho permitirá caracterizar os óleos essenciais de *Rosmarinus officinalis* L. bem como identificar as suas propriedades terapêuticas focadas na vertente antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante, bem como o seu perfil de segurança toxicológico considerando a sua potencial administração por via tópica ou oral.



## **II. Materiais e Métodos**



## I. Materiais e Métodos

### I.1. Material vegetal

Para o presente estudo utilizou-se o óleo essencial das partes aéreas floridas, de *Rosmarinus officinalis* L. (Serra de Aire e Candeeiros) isolado por hidrodestilação durante 3 horas utilizando um aparelho tipo Clevenger, de acordo com o procedimento descrito na farmacopeia Europeia (Farmacopeia Portuguesa, 2005).

### I.2. Análise do óleo essencial

Estudos prévios realizados no laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra permitiram avaliar o perfil químico do óleo essencial por cromatografia gás-líquido e por cromatografia gás-líquido acoplado à espectrometria de massa.

Na Tabela 2, encontra-se a informação relativa ao rendimento em óleo essencial, os principais compostos identificados e a sua proveniência.

**Tabela 2:** Rendimento, compostos principais e proveniência do óleo essencial de *R. officinalis* L.

<b>Espécie</b>	<b>Rendimento</b>	<b>Compostos principais</b>	<b>Proveniência</b>
<i>R. officinalis</i> L.	1.4%	mirreno (24,7%) $\alpha$ -pineno (13,1%) 1,8-cineol (11,7%) cânfora (10%)	Serra de Aire e Candeeiros

## 2. Atividade antimicrobiana

### 2.1. Estirpes fúngicas testadas

A atividade antifúngica do óleo essencial foi avaliada contra diferentes estirpes de leveduras (*Candida spp.* e *Cryptococcus spp.*) e fungos filamentosos (*Dermatófitos* e *Aspergillus spp.*) (Tabela 3).

**Tabela 3:** Estirpes de leveduras e fungos filamentosos testadas e proveniências.

	Estirpes	Proveniência	
Leveduras	<i>Candida krusei</i> H9	Estirpes clínicas isoladas de casos recorrentes de candidíases vulvovaginais.	
	<i>Candida guilliermondii</i> MAT23		
	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231		
	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 90018		
	<i>Candida tropicalis</i> ATCC 13803		
	<i>Cryptococcus neoformans</i> CECT 1078	Colección Espanola decultivos Tipo.	
Fungos filamentosos	<i>A. niger</i> ATCC16404	American Type Culture collection.	
	<i>A. fumigatus</i> ATCC 46645		
	<i>Aspergillus</i>	<i>A. flavus</i> F44	Estirpe clínica isolada de secreções brônquicas.
	Dermatófitos ( <i>Trichophyton</i> , <i>Microsporum</i> , <i>Epidermophyton</i> )	<i>T. mentagrophytes</i> FF7	Estirpes clínicas isoladas de unhas e pele.
		<i>M. canis</i> FF1	
		<i>E. floccosum</i> FF9	
		<i>T. rubrum</i> CECT 2794	
		<i>T. verrucosum</i> CECT 2992 <i>M. gypseum</i> CECT 2908	
		<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i> CECTB 2958	Colección Espanola de cultivos Tipo.

### 2.1.1. Atividade antifúngica

A concentração mínima inibitória (MIC) e a concentração mínima letal (MLC) do óleo essencial de *R. officinalis* foram determinadas segundo o método de macrodiluição de acordo com os protocolos M27-A3 (CLSI, 2008a) e M38-A2 (CLSI, 2008b) do *Clinical and Laboratory Standards Institute* para leveduras e para fungos filamentosos, respetivamente.

Para os ensaios de suscetibilidade utilizou-se o meio líquido RPMI 1640 (Sigma) (sem bicarbonato, com L-glutamina e vermelho fenol como indicador de pH), numa concentração de 10,4 g/L, tamponizado com MOPS [ácido 3- (N- morfolino)-propanossulfónico] na concentração final de 0,165 mol/mL, ajustado a pH 7 com uma solução de NaOH 5M e esterilizado por filtração em membrana de 0,22 µm (micrometro). Fez-se a prova da esterilidade do meio em dois tubos de controlo, após incubação a 37°C.

Diferentes concentrações do óleo essencial a testar foram preparadas em DMSO estéril (dimetil sulfóxido), pipetadas para tubos de vidro estéreis de 12x55 mm, em duplicado para cada estirpe fúngica, obtendo-se concentrações finais que variam entre 20 e 0,16 µL/mL. A concentração final de DMSO nunca excedeu 2 %. Um controlo de esterilidade do meio (controlo negativo) e um controlo de crescimento do fungo em DMSO (controlo positivo), também foram incluídos em cada ensaio.

Para a preparação dos inóculos utilizaram-se culturas recentes de cada estirpe fúngica em SDA (*Sabourond Dextrose Agar*). Para as leveduras prepararam-se suspensões em soro fisiológico estéril a 0.9%, ajustadas visualmente à turvação do tubo 0.5 da escala de MacFarland e confirmada espectrofotometricamente. No caso dos dermatófitos os esporos foram recolhidos, em soro fisiológico, por agitação em vortex com pérolas de vidro estéreis e a suspensão foi ajustada ao tubo 1 da escala de MacFarland.

Para os *Aspergillus* os esporos foram recolhidos por agitação em vortex com pérolas de vidro estéreis e soro fisiológico 0.9%, com adição de uma gota de Tween 20 estéril para evitar a formação de aglomerados acertando-se a concentração do inóculo por contagem em câmara de Neubauer.

Diluíram-se, em tubos Falcon estéreis, as suspensões iniciais dos inóculos numa proporção de 1:500 em meio RPMI, obtendo-se diluições finais de  $1-2 \times 10^3$  células mL<sup>-1</sup> e  $1-2 \times 10^4$  para leveduras e fungos filamentosos, respetivamente. Distribuíram-se 800 µL do meio RPMI inoculado, pelos tubos de controlo positivo e pelos tubos contendo um volume de 16,3 µL das diferentes diluições do óleo essencial.

Incubaram-se os tubos de ensaio, aerobiamente em estufa estática, durante 48/72 horas a 35°C para as estirpes de *Candida spp.*, *Aspergillus spp.* e *Cryptococcus sp.* 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, correspondendo o MIC à concentração mínima do óleo essencial 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. Estas foram incubadas nas mesmas condições 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 óleo essencial que é letal para a estirpe fúngica em teste. Todas as estirpes testadas foram armazenadas a -80 °C e sub-cultivadas antes de cada ensaio em meio SDA (*Saboraud Dextrose Agar*) e PDA (*Potato Dextrose Agar*) para assegurar as boas condições de crescimento e pureza.

Adicionalmente foram usados dois compostos antifúngicos de referência, anfotericina B (FluKa) e fluconazole (Pfizer), para avaliar a sensibilidade dos microorganismos testados.

Todos os resultados foram obtidos a partir de três ensaios independentes realizados em duplicado, repetidos aquando da divergência de resultados.

### 2.1.2. Inibição do tubo germinativo

Determinou-se o efeito do óleo essencial na inibição da 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 µL/mL (controlo positivo) e uma série de diluições do óleo essencial, partindo do valor de MIC, previamente determinado, até MIC/32. 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 subculturas puras e viáveis em SDA, deixadas a crescer *overnight* aerobiamente em estufa estática a 35°C, em tubos de vidro estéreis em meio NYP (*N-acetilglucosamine, Yeast Nitrogen Base*). 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  $\mu\text{L}/\text{mL}$ .

Distribuíram-se 990  $\mu\text{L}$  do meio NYP inoculado pelos tubos de controlo positivo e pelos tubos contendo um volume de 10  $\mu\text{L}$  das diluições do óleo essencial, obtendo-se um intervalo de concentrações sub-inibitórias entre 1,25 e 0,04  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . 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.

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.

## 2.2. Atividade antibacteriana

Para avaliar a atividade antibacteriana do óleo essencial utilizou-se o método de macrodiluição, estudando o seu efeito sobre diferentes estirpes de bactérias segundo o protocolo padronizado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012) M07-A9 para bactérias pelo método de macrodiluição.

### 2.2.1. Estirpes bacterianas testadas

A atividade antibacteriana do óleo essencial foi avaliada contra três estirpes de bactérias de referência da *American Type Culture Collection*, uma bactéria Gram negativa (*Salmonella typhimurium* ATCC 14028) e duas bactérias Gram positivas (*Listeria monocytogenes* CBDSA 3183 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538).

Para os ensaios de susceptibilidade utilizou-se o meio *Muller-Hinton Broth* (MHB) numa concentração de 21 g/L, esterilizado em autoclave a 121°C a 1 atmosfera durante 20 minutos e conservado a 4°C. As bactérias foram repicadas para *Nutrient Agar* (NA) e *Tryptona Soya Agar* (TSA) e incubados 24 h a 37°C. Usando uma ansa estéril, transferiu-se a bactéria para soro fisiológico estéril, homogeneizou-se e acertou-se o inóculo a 0,5 unidades MacFarland ( $1,5 \times 10^8$  bactérias/ mL).

## II. Materiais e Métodos

Diluiu-se a 1/1000 a suspensão inicial de bactérias para obter um inóculo com uma concentração  $1,5 \times 10^5$  bactérias/ mL. Transferiu-se um volume conveniente de suspensão inicial de bactérias para um tubo de Falcon contendo MHB.

Agitou-se no vortex durante 15 segundos e distribuiu-se pelos tubos de ensaio com as diferentes diluições do óleo essencial que foi diluído no momento da utilização em DMSO a partir dos concentrados guardados a 4°C, obtendo diluições que variam entre 20 e 1,25 µL/mL, em duplicado.

Em seguida, distribuiu-se 800 µL do meio MHB inoculado, pelos tubos de controlo positivo e pelos tubos contendo um volume de 16,3 µL das diferentes diluições do óleo essencial.

Os tubos de ensaio foram incubados a 37°C durante 24 h sendo depois determinado o valor do MIC. Este é definido como menor concentração de óleo essencial que inibe o crescimento da bactéria. Para avaliar a concentração mínima letal (MLC), alíquotas de 20 µL foram retiradas dos tubos que não apresentaram crescimento visível, após leitura do MIC, e foram inoculadas em caixas de Petri com *Muller-Hinton Ágar* (MHA) e avaliado o crescimento após 24 h a 37°C. O valor da concentração mínima letal (MLC) é definido como a menor concentração de óleo essencial que mata a bactéria.

Para cada estirpe testada, as condições de crescimento e a esterilidade do meio foram testadas com tubos de controlo. A inocuidade do DMSO também foi verificada na sua maior concentração (2%). Todos os resultados foram obtidos a partir de três ensaios independentes realizados em duplicado, repetidos aquando da divergência de resultados.

A avaliação do crescimento nos respetivos tubos foi realizada através de leituras visuais, (observação de turvação) comparando com o controlo negativo e positivo.

### **3. Atividade anti-inflamatória**

#### **3.1. Diluição do óleo essencial**

O óleo essencial de *R. officinalis* foi diluído em DMSO e meio de cultura adequado para cada linha celular em estudo, nas concentrações de 2,5-0,08  $\mu\text{L/mL}$ .

#### **3.2. Cultura celular**

A linha celular de macrófagos (Raw 264.7), obtida da *American Típe Colection* (TIB-7), foi gentilmente cedida pela Doutora Otilia Vieira do Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra. As células foram cultivadas em *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), suplementado com bicarbonato de sódio 3,02 g/L, penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100  $\mu\text{g/mL}$ , e soro fetal bovino a 10%, e as células mantidas a 37°C numa atmosfera humidificada de 95% de ar e 5% de  $\text{CO}_2$ .

A morfologia das células foi monitorizada regularmente por observação ao microscópio ótico. As células foram utilizadas nos ensaios biológicos quando apresentavam 80-90% de confluência. A viabilidade celular foi confirmada por contagem num hemocítmetro (câmara de Neubauer) utilizando azul de tripano.

#### **3.3. Produção de óxido nítrico (NO)**

A atividade anti-inflamatória do óleo essencial de *R. officinalis* foi avaliada na linha celular de macrófagos (Raw 264.7).

A produção de óxido nítrico (NO) foi determinada com recurso ao método indireto de deteção do NO, que se baseia na quantificação de nitritos que se acumulam nos sobrenadantes das culturas celulares, utilizando uma reação colorimétrica com recurso ao reagente de *Griess* (Cruz *et al.*, 2001; Green *et al.*, 1982).

A linha celular de macrófagos (Raw 264.7) foi cultivada em microplacas de 48 compartimentos (MW 48), numa densidade de  $0,3 \times 10^6$  por poço, e estabilizada durante 14 horas a 37°C numa atmosfera humidificada de 95% de ar e 5% de  $\text{CO}_2$ . Após 14 horas, o meio foi removido e foram adicionados 600  $\mu\text{L}$  de meio de cultura aos poços controlo e 588  $\mu\text{L}$  aos restantes poços, e ainda 12  $\mu\text{L}$  das diluições do óleo essencial (2,5-0,08  $\mu\text{L/mL}$ ). Após

1 hora, as células foram estimuladas com 1 µg/mL de Lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* (serotipo 026:B6) e cultivadas durante 24 horas adicionais.

Após as 24 horas, recolheu-se 170 µL de sobrenadante do meio de cultura e adicionou-se igual volume de reagente de Griess [preparado numa proporção (1:1) de reagente A e reagente B, estáveis a 4°C, em que o reagente A é preparado com sulfanilamida a 1% (m/v) em H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> a 5% (v/v) em H<sub>2</sub>O mili-Q e o reagente B com N-(1-naftil)-etilenodiamina a 0,1% (m/v) em H<sub>2</sub>O mili-Q] numa placa de cultura de 96 compartimentos. A placa foi mantida ao abrigo da luz durante 30 minutos à temperatura ambiente. A absorvância foi lida a 550 nm num leitor automático de microplacas.

Foram realizados três ensaios independentes com o óleo essencial de *R. officinalis* e os resultados foram expressos em percentagem de produção de nitritos pelas células cultivadas na presença de LPS.

## 4. Avaliação da citotoxicidade

### 4.1. Culturas celulares

A metodologia de cultura da linha celular de macrófagos (Raw 246,7) foi anteriormente descrita na secção 3.2.

A linha celular de epitélio alveolar humano (A549) foi adquirida à ATCC (número CCL-185). As células do epitélio alveolar foram cultivadas em *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (alto teor de glucose), suplementado com bicarbonato de sódio 3,7 g/L, penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 µg/mL, glutamina 4 mM, soro fetal de bovino inativado pelo calor a 10 % e as células foram mantidas a 37°C numa atmosfera humidificada de 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub>.

A linha celular de queratinócitos humanos (HaCaT), adquirida à DKFZ (Heidelberg), foi gentilmente cedida pela Doutora Eugénia Carvalho. Os queratinócitos foram cultivados em condições idênticas às utilizadas para as células do epitélio alveolar acima referidas.

A linha celular de hepatócitos humanos (HepG2) adquirida na ATCC (número: 77400), foi gentilmente fornecida pela Doutora Conceição Pedrosa Lima. Os hepatócitos foram cultivados em *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (baixo teor de glucose), suplementado com bicarbonato de sódio 1,5 g/L, penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 µg/mL, soro fetal bovino inativado pelo calor a 10% e mantidas a 37°C numa atmosfera humidificada de 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub>.

A linha celular de intestino humano (Caco-2) adquirida à ATCC (número HTB-37 TM) e gentilmente cedida por Doutor Marco Lemos. As Caco-2 foram cultivadas em *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (alto teor de glucose) suplementado com penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 µg/mL, soro fetal bovino a 10% e mantidas a 37°C numa atmosfera humidificada de 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub>.

A morfologia das células foi monitorizada regularmente por observação ao microscópio óptico; as células foram utilizadas nos ensaios biológicos quando estas apresentavam 80-90% de confluência. A viabilidade celular foi confirmada por contagem num hemocítmetro (câmara de *Neubauer*) utilizando o corante azul de tripano.

#### **4.2. Determinação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT**

A viabilidade celular foi avaliada para o óleo essencial de *R. officinalis* L., nas linhas celulares de: macrófagos (Raw 264.7), epitélio alveolar (A549), queratinócitos (HaCaT), hepatócitos (HepG2), e intestinais (Caco-2).

A avaliação da viabilidade celular foi realizada através de um ensaio colorimétrico usando o composto 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio (MTT), anteriormente descrito por Mosman, 1993. Neste método, a densidade ótica da solução contendo os cristais azuis de formazano produzidas por células metabolicamente ativas foi quantificado por espectrofotometria.

As linhas celulares Raw 264.7, A549, HaCaT, HepG2 e Caco-2 foram cultivadas nas densidades de:  $0,6 \times 10^6$ ;  $0,2 \times 10^6$ ;  $0,2 \times 10^6$ ;  $0,2 \times 10^6$ ;  $0,2 \times 10^6$  células por poço, respetivamente. As células foram cultivadas em microplacas de 48 compartimento e incubadas num volume final de 600 µL durante 12 horas, com exceção das Caco-2 que foram incubadas durante 24 horas e posteriormente estimuladas com 12 µL das diferentes concentrações (2,5-0,08 µL/mL) de óleo essencial durante 24 horas.

Após 24h, adicionaram-se 43µL de uma solução de MTT (5 mg/mL em PBS), por poço às células Raw 264.7 e 60 µL para as restantes células. As células foram posteriormente incubadas a 37°C, numa atmosfera humificada de 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub>. Os queratinócitos, macrófagos e hepatócitos foram incubados durante 60 minutos e as células do epitélio alveolar e intestinais durante 90 minutos. Após estes tempos de incubação com MTT, os sobrenadantes foram descartados por aspiração e adicionaram-se 300 µL de isopropanol ácido (0,04 N HCl em isopropanol) às células aderentes para solubilizar os cristais azuis de

formazano. A quantificação de cristais de formazano foi realizada utilizando um leitor automático de microplacas ELISA, com um comprimento de onda de 570 nm e com um filtro de referência de 620 nm.

Foram realizados três ensaios independentes para o óleo essencial e os resultados expressos comparativamente com a percentagem de redução do MTT por células cultivadas com o LPS e o solvente do óleo essencial (DMSO) para os macrófagos e meio de cultura com o solvente do óleo essencial (DMSO) para as restantes células.

Para avaliar a fiabilidade das técnicas utilizadas, usaram-se vários controlos:

- ✚ Concentração máxima de óleo essencial utilizada mais meio de cultura isento de células;
- ✚ Meio de cultura isento de células;
- ✚ Meio de cultura mais células;
- ✚ Concentração máxima de DMSO, meio de cultura e células.

## 5. Análise de dados

Os resultados são apresentados sob a forma da média  $\pm$  SEM (erro padrão da média) do número de experiências indicadas. Para o tratamento estatístico dos resultados realizou-se uma análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do pós teste de *Dunnett's*, para comparar o efeito das diferentes concentrações de óleo essencial comparativamente com o controlo (nível de significância: \*\*\* $p < 0,001$ ). As análises estatísticas foram aplicadas usando o programa GraphPadPrism, versão 5.02 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## 6. Atividade antioxidante

Foram realizados dois ensaios com modificações do método de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) para quantificar a capacidade antioxidante do óleo essencial de *R. officinalis* na ausência e na presença de um indutor de peroxidação lipídica (ABAP).

### ✓ Na ausência do ABAP

Utilizou-se como meio rico em lípidos a gema de ovo, tal como descrito por Dorman *et al.* (2000) em que uma alíquota da gema de ovo foi feita até uma concentração de 10% p/v

em KCL (1,15% p/v). A gema foi homogeneizada durante 30 segundos e “ultrassonicada” por 5 minutos. De seguida foram adicionados aos tubos de ensaio 500 µL do preparado de gema de ovo e 100 µL da amostra ou controlos positivo de hidroxitolueno butilado (BHT) e hidroxianisole butilado (BHT), ambos diluídos em metanol nas diferentes concentrações (0,2, 0,15, 0,10 e 0,05 µg/mL), perpez-se com água milliQ para um volume final de 1 mL, seguido pela adição de 1,5 mL de ácido acético (20% p/v; pH 3,5) e 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,8% dissolvido em Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) a 1,1%. Esta mistura foi agitada num vórtex e aqueceu-se a 95°C durante 60 minutos. Após esse período de tempo foram deixadas a arrefecer em banho (temperatura ambiente) ao abrigo da luz por 20 minutos e adicionadas aos tubos após arrefecimento 5 mL de n-butanol, agitadas em vórtex por 5 segundos e centrifugadas a 4500 rpm, 4°C por 10 minutos. A absorvância do sobrenadante foi medida a 532 nm usando um espectrofotómetro (Cintra 101 GBC) da *software Cintral General Applications*.

✓ Na presença do ABAP

Para induzir a peroxidação lipídica adicionaram-se aos tubos de ensaio 50 µL de 2,2-azobis-(2-amidinopropano) (ABAP) (0,07 M) logo após a adição da amostra, sendo o restante procedimento como acima descrito.

A percentagem de inibição foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$\% \text{ Inibição} = \frac{(\text{Ac} - \text{Aa})}{\text{Ac}} \times 100$$

onde Ac é a absorvância do controlo (sem amostra) e Aa é a absorvância na presença da amostra. Os resultados foram expressos pela média ± SEM de três ensaios independentes.





### **III- Resultados**



## I. Atividade antimicrobiana

### I.1. Atividade antifúngica

Os resultados obtidos para a atividade antifúngica (MIC e MLC) do óleo essencial de *R. officinalis* estão apresentados na Tabela 4.

O óleo essencial mostrou atividade antifúngica com valores de MIC entre 2,5-5 µL/mL para *Candida* spp., 0,64 µL/mL para *C. neoformans*, 0,64-2,5 µL/mL para os fungos dermatófitos e 5 - ≥10 µL/mL para *Aspergillus* spp.

De um modo geral os valores de MLC são semelhantes aos do MIC para as estirpes estudadas, com exceção de *C. albicans*, *C. neoformans* e para as 3 estirpes de *Aspergillus*, variando apenas numa diluição.

**Tabela 4:** Atividade antifúngica (MIC e MLC) do óleo essencial de *R. officinalis*, contra estirpes de *Candida*, dermatófitos e *Aspergillus*.

Estirpes			Fluconazole		Anfotericina B	
	MIC <sup>a</sup>	MLC <sup>a</sup>	MIC <sup>b</sup>	MLC <sup>b</sup>	MIC <sup>b</sup>	MLC <sup>b</sup>
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	1,25	2,5	1	>128	N.T <sup>c</sup>	N.T
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 13803	5	5	4	>128	N.T	N.T
<i>Candida krusei</i> H9	5	5	64	64-128	N.T	N.T
<i>Candida guilliermondii</i> MAT23	2,5	5	8	8	N.T	N.T
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 90018	5	5-10	<1	<1	N.T	N.T
<i>Cryptococcus neoformans</i> CECT 1078	0,64	1,25	16	128	N.T	N.T
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> FF7	2,5	2,5	16-32	32-64	N.T	N.T
<i>T. rubrum</i> CECT 2794	1,25	1,25-2,5	16	64	N.T	N.T
<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i> CECT 2958	2,5	2,5	128	≥128	N.T	N.T
<i>T. verrucosum</i> CECT 2992	1,25	2,5	>128	>128	N.T	N.T
<i>Microsporum canis</i> FF1	1,25	1,25	128	128	N.T	N.T
<i>M. gypseum</i> CECT 2908	2,5	2,5	128	>128	N.T	N.T
<i>Epidermophyton floccosum</i> FF9	0,64-1,25	0,64-1,25	16	16	N.T	N.T
<i>Aspergillus niger</i> ATCC16404	5	>10	N.T	N.T	1-2	4
<i>A. fumigatus</i> ATCC 46645	5	>10	N.T	N.T	2	4
<i>A. flavus</i> F44	≥10	>10	N.T	N.T	2	8

<sup>a</sup>MIC e MLC determinadas pelo método de macrodiluição e expressas em µL/mL (v/v).

<sup>b</sup>MIC e MLC determinadas pelo método de macrodiluição e expressas em µg/mL (p/v).

<sup>c</sup>N.T – Não testado. Resultados obtidos a partir de três ensaios independentes realizados em duplicado.

### I.1.1. Inibição do tubo germinativo

Os resultados da percentagem de filamentação de *C. albicans* ATCC 10231 quando exposta a diferentes concentrações (0,04-1,25  $\mu\text{L/mL}$ ) de óleo essencial de *R. officinalis* estão representados na Tabela 5.

O óleo essencial inibiu totalmente a formação do tubo germinativo na concentração de 0,64  $\mu\text{L/mL}$ , tendo ocorrido uma percentagem mínima de filamentação na concentração de 0,16  $\mu\text{L/mL}$ . Na concentração de 0,08  $\mu\text{L/mL}$  foi observado ainda uma elevada percentagem de inibição (63,2%) em comparação com as células não tratadas.

**Tabela 5:** Percentagem de filamentação de *Candida albicans* ATCC 10231 incubada com as concentrações sub-inibitórias do óleo essencial de *R. officinalis* ( $\mu\text{L/mL}$ ).

<b><i>R. officinalis</i> (média <math>\pm</math> desvio padrão)</b>	
Controlo <sup>(a)</sup>	100
MIC/32 (0,04 $\mu\text{L/mL}$ )	59,7 $\pm$ 2.2
MIC/16 (0,08 $\mu\text{L/mL}$ )	36,8 $\pm$ 1.4
MIC/8 (0,16 $\mu\text{L/mL}$ )	2,6 $\pm$ 0.9
MIC/4 (0,32 $\mu\text{L/mL}$ )	1 $\pm$ 0.0
MIC/2 (0,64 $\mu\text{L/mL}$ )	0 $\pm$ 0
MIC (1,25 $\mu\text{L/mL}$ )	0 $\pm$ 0

<sup>a</sup>Amostra sem óleo essencial, apenas com 1% de DMSO e considerada como controlo com 100% de filamentação.

<sup>b</sup>Concentração absoluta de óleo essencial em  $\mu\text{L/mL}$ .

Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de três experiências independentes.

## I.2. Atividade antibacteriana

Os resultados obtidos para a atividade antibacteriana do óleo essencial de *R. officinalis* estão representados na Tabela 6. O óleo essencial de *R. officinalis* mostrou atividade antibacteriana para as três estirpes testadas com valores de MIC de 2,5-5  $\mu\text{L}/\text{mL}$ .

**Tabela 6:** Atividade antibacteriana (MIC e MLC) do óleo essencial de *R. officinalis* contra três estirpes de bactérias.

Estirpes	<i>R. officinalis</i> ( $\mu\text{L}/\text{mL}$ )	
	MIC <sup>a</sup>	MLC <sup>a</sup>
<i>Listeria monocytogenes</i> CBDSA 3183	2,5	10
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	5	5
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	2,5	10-20

<sup>a</sup>MIC e MLC determinadas pelo método de macrodiluição e expressas em  $\mu\text{L}/\text{mL}$  (v/v).  
Resultados obtidos a partir de três ensaios independentes realizados em duplicado.

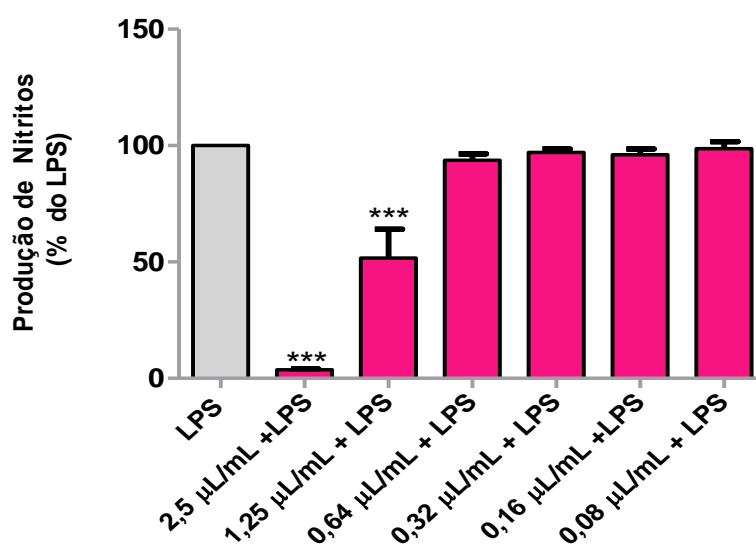
Tendo por base as concentrações mínimas letais (MLC) as estirpes de *Staphylococcus aureus* e de *Listeria monocytogenes* são menos sensíveis ao óleo essencial uma vez que necessitaram de maior quantidade de óleo para haver a morte destas estirpes. O óleo inibiu o crescimento do *Staphylococcus aureus* e de *Listeria monocytogenes* em menores concentrações, mas, relativamente a estas mesmas estirpes, foram necessárias maiores concentrações de óleo para causar a morte celular, comparativamente às necessárias para destruir a estirpe de *Samonella typhimurium*.

## 2. Atividade anti-inflamatória

Para o presente trabalho o potencial anti-inflamatório do óleo essencial de *R. officinalis* foi avaliada em diferentes concentrações (2,5-0,08  $\mu\text{L/mL}$ ), na linha celular de macrófagos (Raw 264,7) ativadas com LPS.

### 2.1. Efeito do óleo essencial na produção de óxido nítrico induzida por LPS em macrófagos (Raw 264.7).

O efeito do óleo essencial na produção de NO desencadeada por LPS foi avaliado na linha celular de macrófagos (Raw 264.7). Na presença do LPS, os macrófagos produzem quantidades elevadas de NO, que por ser um radical altamente instável origina rapidamente nitritos em meio aquoso, quantificados através do reagente de Griess. Após o estímulo das células com o LPS na presença das diferentes concentrações do óleo essencial, a produção de nitritos teve redução significativa nas concentrações de 2,5  $\mu\text{L/mL}$  ( $3,67 \pm 0,33$ ) e 1,25  $\mu\text{L/mL}$  ( $51,67 \pm 12,45$ ), sendo essas concentrações citotóxicas (Figura 5), o que demonstra que a redução observada se deve à citotoxicidade do óleo e não a uma redução na produção de NO. A produção de NO não apresentou redução significativa nas concentrações de 0,64  $\mu\text{L/mL}$  ( $93,67 \pm 2,73$ ), 0,32  $\mu\text{L/mL}$  ( $97,0 \pm 1,53$ ), 0,16  $\mu\text{L/mL}$  ( $96,0 \pm 2,52$ ) e 0,08  $\mu\text{L/mL}$  ( $98,67 \pm 2,96$ ) (Figura 4).



**Figura 4:** Efeito do óleo essencial de *R. officinalis* na inibição da produção de nitritos em macrófagos (Raw 264.7). Utilizou-se como controlo as células estimuladas com o LPS e o solvente do óleo essencial (DMSO). Os resultados estão expressos em percentagem de produção de nitritos pelas células na presença de LPS. Cada valor corresponde a média  $\pm$  SEM de três ensaios independentes, realizadas em duplicado (\*\* $p < 0,001$ ), comparado com o LPS).

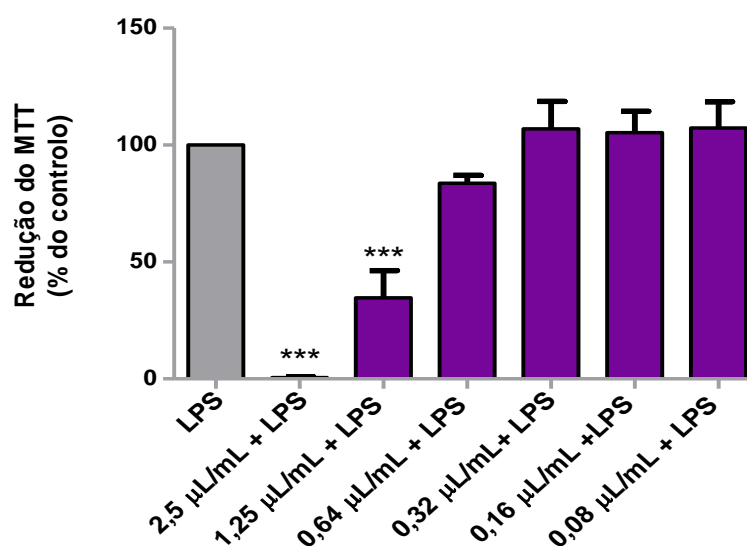
### 3. Avaliação da viabilidade celular

Com o objetivo de avaliar a possível ação citotóxica do óleo essencial de *R. officinalis*, realizou-se o ensaio de MTT nas linhas celulares de macrófagos de ratinho (Raw 264.7), células do epitélio alveolar humano (A549), queratinócitos humanos (HaCaT), hepatócitos humanos (Hep G2) e células intestinais humanas (Caco-2).

#### 3.1. Efeito do óleo essencial na viabilidade celular de macrófagos (Raw 264,7), na presença do LPS

Por forma a averiguar se a redução da produção do NO verificada na figura 4 se devia a um efeito anti-inflamatório do óleo essencial ou a um efeito citotóxico do mesmo, realizou-se o ensaio de MTT na linha celular de macrófagos (Raw 264,7) na presença do LPS.

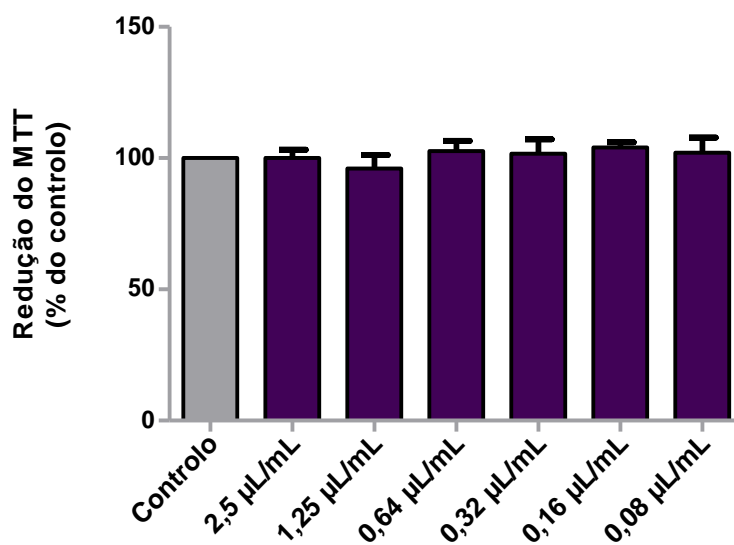
De acordo com a Figura 5, é notório que o óleo essencial de *R. officinalis* apresentou citotoxicidade para as concentrações de 2,5  $\mu\text{L/mL}$  ( $0,56 \pm 0,09$ ) e 1,25  $\mu\text{L/mL}$  ( $34,72 \pm 2,68$ ), não sendo citotóxica para as concentrações de 0,64  $\mu\text{L/mL}$  ( $83,64 \pm 0,74$ ), 0,32  $\mu\text{L/mL}$  ( $106,9 \pm 2,74$ ), 0,16  $\mu\text{L/mL}$  ( $105,4 \pm 2,11$ ) e 0,08  $\mu\text{L/mL}$  ( $107,3 \pm 2,63$ ).



**Figura 5:** Efeito do óleo essencial de *R. officinalis* na viabilidade celular de macrófagos (Raw 264,7) pelo ensaio do MTT. Os resultados estão expressos em percentagem de redução do MTT nas células metabolicamente ativas. Utilizou-se como controlo as células cultivadas na presença do LPS e do solvente do óleo essencial (DMSO). Cada valor corresponde a média  $\pm$  SEM de três ensaios independentes, realizadas em duplicado (\*\*\*) $p < 0,001$ , comparado com o LPS).

### 3.2. Efeito do óleo essencial na viabilidade de células do epitélio alveolar (A549)

Na Figura 6 estão apresentados os resultados relativos à citotoxicidade do óleo essencial de *R. officinalis* em células humanas do epitélio alveolar. O óleo demonstrou ausência de toxicidade para todas as concentrações testadas: 2,5  $\mu\text{L/mL}$  ( $100 \pm 3,22$ ), 1,25  $\mu\text{L/mL}$  ( $96 \pm 5,13$ ), 0,64  $\mu\text{L/mL}$  ( $102,7 \pm 3,93$ ), 0,32  $\mu\text{L/mL}$  ( $101,7 \pm 5,49$ ), 0,16  $\mu\text{L/mL}$  ( $104 \pm 2,08$ ), 0,08  $\mu\text{L/mL}$  ( $102 \pm 5,86$ ).

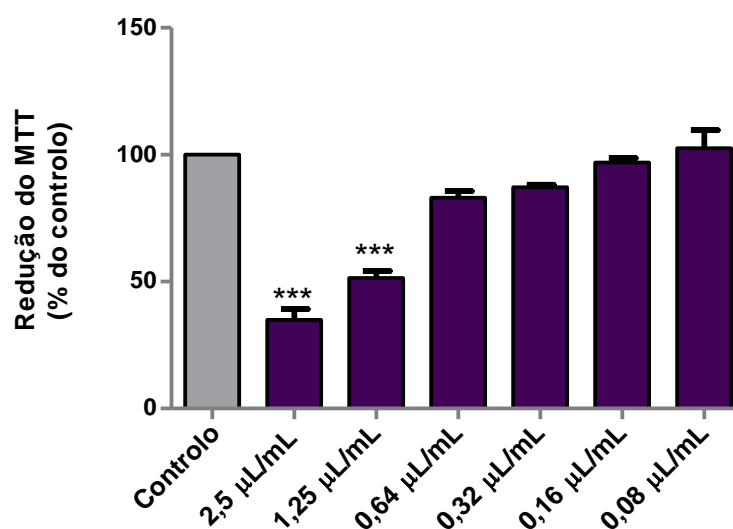


**Figura 6:** Efeito do óleo essencial de *R. officinalis* na viabilidade de células do epitélio alveolar (A549) pelo ensaio de MTT. Os resultados estão expressos em porcentagem de redução do MTT por células cultivadas na presença de meio de cultura e do solvente do óleo essencial (DMSO) (controle). Cada valor corresponde a média  $\pm$  SEM de três ensaios independentes, realizadas em duplicado.



### 3.3. Efeito do óleo essencial na viabilidade celular de queratinócitos (HaCaT)

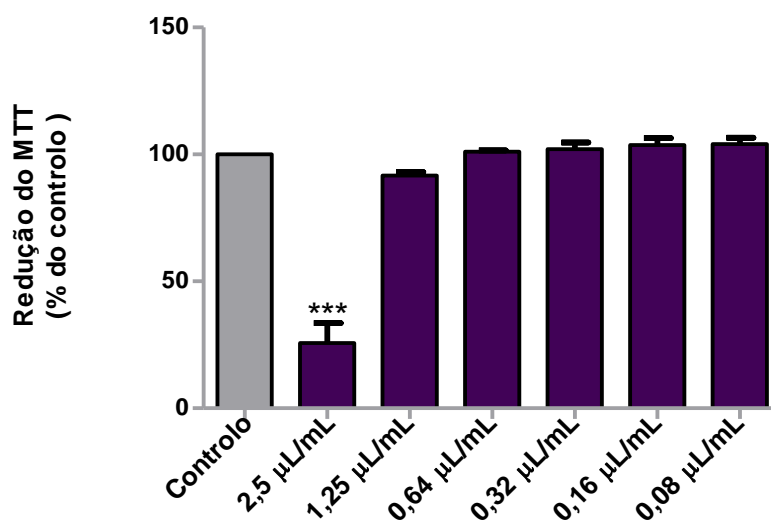
Como demonstrado na Figura 7, o óleo essencial de *R. officinalis* demonstrou citotoxicidade para queratinócitos humanos nas concentrações de 2,5  $\mu\text{L/mL}$  ( $35 \pm 4,15$ ) e 1,25  $\mu\text{L/mL}$  ( $51,59 \pm 2,65$ ). As concentrações de 0,64  $\mu\text{L/mL}$  ( $83,10 \pm 2,55$ ), 0,32  $\mu\text{L/mL}$  ( $87,23 \pm 0,91$ ), 0,16  $\mu\text{L/mL}$  ( $96,99 \pm 1,76$ ) e 0,08  $\mu\text{L/mL}$  ( $102,6 \pm 7,11$ ) não revelaram citotoxicidade.



**Figura 7:** Efeito do óleo essencial de *R. officinalis* na viabilidade celular de queratinócitos (HaCaT) pelo ensaio de MTT. Os resultados estão expressos em percentagem de redução do MTT por células cultivadas na presença de meio de cultura e do solvente do óleo essencial (DMSO) (controle). Cada valor corresponde a média  $\pm$  SEM de três ensaios independentes, realizadas em duplicado (\*\*\*) $p < 0,001$ , comparado com o controle).

### 3.4. Efeito do óleo essencial na viabilidade celular de hepatócitos (Hep G2)

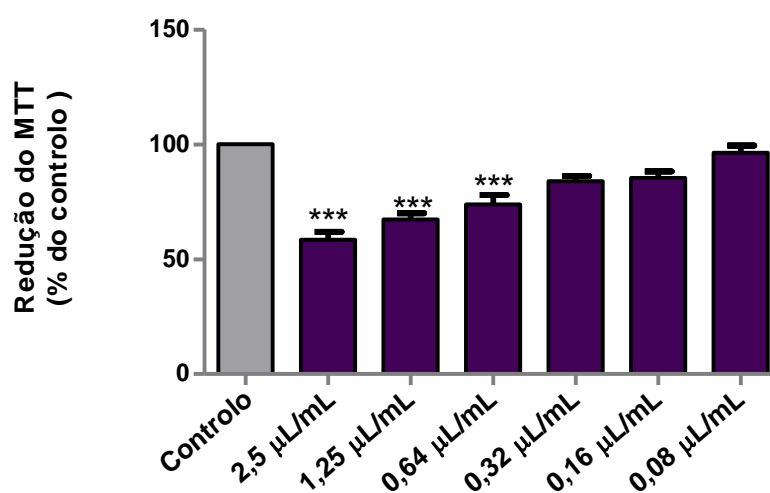
Como demonstrado na Figura 8, o óleo essencial de *R. officinalis* não apresentou citotoxicidade significativa em hepatócitos humanos para as concentrações de 1,25 µL/mL (91,67 ± 1,45), 0,64 µL/mL (101,0 ± 0,58), 0,32 µL/mL (102,0 ± 2,65), 0,16 µL/mL (103,6 ± 2,84) e 0,08 µL/mL (104,0 ± 2,52). A concentração de 2,5 µL/mL (25,67 ± 7,67) revelou-se citotóxica.



**Figura 8:** Efeito do óleo essencial de *R. officinalis* na viabilidade celular de hepatócitos (HepG2) pelo ensaio de MTT. Os resultados estão expressos em percentagem de redução do MTT por células cultivadas na presença do meio de cultura e do solvente do óleo essencial (DMSO) (controle). Cada valor corresponde a média ± SEM de três ensaios independentes, realizadas em duplicado (\*\*\*) $p < 0,001$ , comparado com o controle).

### 3.5. Efeito do óleo essencial na viabilidade de células intestinais (Caco-2)

Como demonstrado na Figura 9, o óleo essencial de *R. officinalis* não apresentou citotoxicidade nas concentrações de 0,32  $\mu\text{L/mL}$  ( $83,93 \pm 2,27$ ), 0,16  $\mu\text{L/mL}$  ( $85,42 \pm 2,81$ ) e 0,08  $\mu\text{L/mL}$  ( $96,35 \pm 3,17$ ). As concentrações de 2,5  $\mu\text{L/mL}$  ( $58,47 \pm 3,41$ ), 1,25  $\mu\text{L/mL}$  ( $67,28 \pm 2,77$ ) e 0,64  $\mu\text{L/mL}$  ( $73,81 \pm 4,23$ ) revelaram ser citotóxicas para células intestinais humanas (Caco-2).



**Figura 9:** Efeito do óleo essencial de *R. officinalis* na viabilidade de células intestinais humanas (Caco-2), pelo ensaio de MTT. Os resultados estão expressos em percentagem de redução do MTT por células cultivadas na presença de meio de cultura e do solvente do óleo essencial (DMSO) (controle). Cada valor corresponde a média  $\pm$  SEM de três ensaios independentes, realizadas em duplicado (\*\*\*) $p < 0,001$ , comparado com o controle).

#### 4. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante do óleo essencial de *R. officinalis* foi avaliada pelo método modificado de substância reativa do ácido tiobarbitúrico (TBARS). As diluições do óleo essencial e dois padrões comerciais (BHA e BHT) foram avaliados em diferentes concentrações (0,2, 0,15, 0,10 e 0,05 µg/mL) na ausência e na presença de um indutor de peroxidação lipídica, o 2,2-azobis-(2-amidinopropano) (ABAP). De acordo com os resultados apresentados na Tabela 7, o óleo essencial demonstrou ter atividade antioxidante nas concentrações de 0,2 µg/mL (81,59±1,71) e 0,15 µg/mL (73,01±1,07) quando comparado com os padrões nas mesmas concentrações, na ausência do ABAP.

O óleo essencial em estudo demonstrou baixa atividade antioxidante na presença do indutor de peroxidação lipídica (ABAP) comparado com os padrões BHA e BHT.

**Tabela 7:** Atividade antioxidante (%) do óleo essencial de *R. officinalis* e dos padrões BHA e BHT, em diferentes concentrações utilizando o ensaio de TBARS na presença e na ausência do ABAP.

	Padrões/OER	Concentrações, média±SEM (µg/mL)			
		0,2	0,15	0,1	0,05
Na <b>ausência</b> do ABAP	BHA	64,10±1,27	60,57±1,11	58,03±1,21	52,81±0,38
	BHT	95,35±0,43	93,20±1,11	89,62±0,51	84,65±0,92
	OER*	81,59±1,71	73,01±1,07	38,74±2,99	24,89±1,88
Na <b>presença</b> do ABAP	BHA	89,94±0,96	88,56±1,27	86,25±1,57	79,94±0,80
	BHT	71,77±0,79	68,34±0,50	66,14±0,64	63,99±0,87
	OER*	45,97±1,14	33,70±2,40	20,37±1,17	12,60±1,14

OER\* óleo essencial de *R. officinalis*

SEM- Erro padrão da media

## **IV- Discussão e conclusões**



Atualmente diversos estudos científicos têm enfatizado o potencial biológico dos óleos essenciais, obtidos de plantas aromáticas e medicinais (Miguel, 2010; Sousa *et al.*, 2013, Morales *et al.*, 2014).

Patologias causadas por microorganismos patogênicos, nomeadamente fungos e bactérias têm representado um sério risco para a população em todo o mundo, sendo responsáveis por uma elevada taxa de mortalidade, particularmente devido à resistência dos microorganismos aos antibióticos convencionais (Nikaido *et al.*, 2009; Barreto *et al.*, 2014). Desta forma, a procura de compostos antimicrobianos naturais tem sido de grande interesse a nível científico e clínico, pelo que as plantas aromáticas e medicinais representam um papel fulcral na procura de moléculas biologicamente ativas, contra diferentes microorganismos (Bassolé e Juliani, 2012).

Estudos científicos efetuados nas últimas décadas têm revelado que a maioria das doenças crónicas, incluído cancro, esclerose múltipla, doenças neurodegenerativas e doenças cardiovasculares, estão associados à inflamação crónica (Francisco *et al.*, 2011; Ferrero-Mliliani *et al.*, 2007). A inflamação é um processo imunológico complexo mediado pela ativação de células do sistema imunológico inato, nomeadamente macrófagos. Os macrófagos desempenham um papel fundamental na resposta do hospedeiro contra agentes patogênicos (Ohnishi *et al.*, 2011). A ativação dos macrófagos com estímulos inflamatórios, como LPS, resulta na libertação e acumulação de mediadores pró-inflamatórios como o óxido nítrico (NO) (Zhu *et al.*, 2013). Neste sentido, o NO é um biomarcador da inflamação e estratégias terapêuticas que inibam a sua produção poderão ter um forte potencial anti-inflamatório.

A oxidação assim como a contaminação microbiana têm sido uma das maiores causas de deterioração dos alimentos, causando grandes perdas económicas e problemas de saúde pública. Antioxidantes sintéticos como BHA e BHT são largamente utilizados em processamentos industriais, no entanto apresentam toxicidade nomeadamente carcinogenicidade (Ames, 1983). Deste modo antioxidantes naturais têm sido recentemente utilizados nas indústrias alimentares e farmacêuticas em substituição dos antioxidantes sintéticos.

Neste contexto, multidisciplinar teve por objetivo principal valorizar o óleo essencial de *R. officinalis* oriundo de Portugal, através do estudo das suas propriedades antifúngicas, contra varias estirpes patogênicas para o ser homem e outros animais, bem como a inibição do tubo germinativo, um importante fator de virulência, e ainda o estudo da atividade

## VI. Referências bibliográficas

antibacteriana contra 3 estirpes de bactérias, nomeadamente *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* tendo por base os valores de MIC e MLC. O potencial anti-inflamatório do óleo essencial de *R. officinalis* foi também avaliada num modelo *in vitro*, representativo da inflamação periférica, utilizando a linha celular de macrófagos (Raw 264.7) estimulada com o LPS. Paralelamente testou-se a citotoxicidade do óleo essencial na mesma linha celular na presença de LPS, com o objetivo de confirmar se a possível inibição da produção de NO se devia a morte celular.

Tendo em conta que a avaliação de potenciais fitofármacos constitui uma etapa crucial antes da validação das biomoléculas para fins farmacêuticos, cosméticos e alimentares, neste estudo avaliou-se também a citotoxicidade do óleo essencial em linhas celulares de queratinócitos (HaCaT), hepatócitos (Hep G2), células do epitélio alveolar (A549) e células do intestino humano (Caco-2), com o objetivo de identificar concentrações bioativas e seguras do óleo essencial.

Paralelamente, no presente trabalho avaliou-se ainda a atividade antioxidante do óleo essencial pelo método de TBARS, na presença e na ausência de um indutor de peroxidação lipídica (ABAP).

Os ensaios da avaliação da atividade antifúngica mostraram que o *C. neoformans* apresenta maior sensibilidade para o óleo essencial de *R. officinalis* na concentração de 0,64 µL/mL. As estirpes de *C. parapsilosis* ATCC 90018, *Candida tropicalis* ATCC 13803 e *Candida krusei* H9 foram as menos sensíveis com concentrações de MIC de 5 µL/mL e MLC 5-10 µL/mL. Um estudo recente demonstrou que a associação do óleo essencial de *R. officinalis* com antibióticos é mais eficaz contra a *Candida krusei*, do que as duas estratégias terapêuticas isoladamente (Barreto *et al.*, 2014). A *Candida albicans* ATCC 10231 demonstrou ser mais sensível ao óleo com valores de MIC e MLC entre 2,5 e 1,25 µL/mL.

O efeito do óleo essencial também foi avaliado na inibição do tubo germinativo de *Candida albicans* ATCC 10231, que é um fator importante de patogenicidade na invasão de tecidos. O óleo essencial inibiu totalmente a formação do tubo germinativo na concentração de 0,64 µL/mL, tendo ocorrido uma percentagem mínima de filamentação na concentração de 0,16 µL/mL. Na concentração de 0,08 µL/mL foi observado ainda uma elevada percentagem de inibição (63,2%) em comparação com as células não tratadas. Uma vez que esta estrutura tende a precipitar casos sintomáticos em doentes imunodeprimidos, e a proliferação de candidíase em portadores assintomáticos (Palmeira-de Oliveira *et al.*, 2009),



o fato do óleo inibir a sua formação, torna-o um promissor agente antifúngico utilizável na indústria farmacêutica.

Em fungos dermatófitos os valores de MIC variaram entre as diferentes estirpes testadas com valores compreendidos entre 2,5 e 0,64  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . Na maioria dos casos os valores de MIC foram iguais aos do MLC apresentando o óleo um efeito fungicida. *Epidermophyton floccosum* é o fungo dermatófito que apresentou uma maior sensibilidade ao óleo essencial com um MIC de 0,64  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , sendo esta concentração não citotóxica para os queratinócitos. Estes resultados enfatizam as propriedades fungicidas do óleo essencial que poderá ter aplicação tópica no tratamento de infecções causadas por fungos dermatófitos.

O óleo essencial inibiu o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* na concentração de 2,5  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , porém foram necessárias concentrações mais elevadas para haver morte celular ( $>10$   $\mu\text{L}/\text{mL}$ ). Relativamente a *Salmonella typhimurium* foram necessárias maiores concentrações de óleo essencial (5  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) para inibir o crescimento celular relativamente a *S. aureus* e *L. monocytogenes*.

Os resultados obtidos estão em concordância com estudos realizados por outros investigadores, que demonstraram que o óleo essencial de *R. officinalis* possui atividade antibacteriana para diversos microorganismos de origem alimentar tais como, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Shigella Disenteria*, *Bacillus cereus* (Burt, 2004; Miresmailli et al., 2006; Jiang et al., 2011; Jordán et al., 2013). No entanto são necessárias concentrações elevadas de óleo essencial para exercer atividade antibacteriana.

Os ensaios anti-inflamatórios realizados neste trabalho avaliaram a capacidade do óleo essencial inibir a produção de NO estimulada por LPS em macrófagos e permitiram concluir que o mesmo inibiu significativamente a produção de NO nas concentrações de 2,5 e 1,25  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . No entanto, estas concentrações apresentaram citotoxicidade celular, permitindo concluir que, neste modelo celular, o óleo essencial de *R. officinalis* não exerceu atividade anti-inflamatória. Estudos científicos realizados *in vivo*, usando o modelo inflamatório do edema da pata em ratos, demonstraram que o óleo essencial de *R. officinalis* apresenta potencial terapêutico no tratamento de doenças com um componente inflamatório. No entanto, o efeito terapêutico do óleo essencial de *R. officinalis* depende das concentrações utilizadas e da relação dose-resposta (Juhás et al., 2009), pelo que os mecanismos celulares e moleculares subjacentes aos efeitos anti-inflamatórios do óleo essencial de *R. officinalis* deverão ser estudados e aprofundados.

## VI. Referências bibliográficas

Relativamente à citotoxicidade do óleo essencial de *R. officinalis*, testado nas concentrações de 2,5 a 0,08  $\mu\text{L/mL}$ , pelo ensaio de MTT, verificou-se que concentrações iguais ou inferiores a 0,64  $\mu\text{L/mL}$  não apresentaram citotoxicidade para a maior parte das células em estudo, nomeadamente macrófagos (Raw 264,7), células do epitélio alveolar (A549), queratinocitos (HaCaT) e hepatócitos (Hep G2). Em células intestinais humanas (Caco-2) o óleo essencial não apresentou citotoxicidade para concentrações inferiores a 0,32  $\mu\text{L/mL}$ . Estes resultados demonstram que o óleo essencial apresenta segurança toxicológica, sendo possível utilizar concentrações de 0,64  $\mu\text{L/mL}$  e 0,32  $\mu\text{L/mL}$  em formulações para administração tópica e oral, respetivamente.

O óleo essencial de *R. officinalis* demonstrou potencial atividade antioxidante nas concentrações de 0,2 e 0,15  $\mu\text{g/mL}$ , avaliada pelo ensaio de TBARS, relativamente aos padrões comerciais BHA e BHT na ausência do ABAP. Estes resultados demonstram que o óleo essencial de *R. officinalis* é um potencial antioxidante natural que poderá ser utilizado como aditivo na indústria alimentar proporcionando proteção contra a degradação oxidativa nos alimentos. Estes resultados estão de acordo com outros estudos efetuados demonstrando que o óleo essencial de *R. officinalis*, bem como os seus compostos maioritários, apresentam atividade antioxidante significativa (Wang *et al.*, 2008; Bereta *et al.*, 2011). Por outro lado o óleo essencial em estudo apresentou baixa atividade antioxidante na presença do indutor de peroxidação lipídica (ABAP), relativamente aos padrões BHA e BHT. Estes resultados sugerem que o óleo essencial de *R. officinalis* é pouco eficaz na reversão de um estado oxidativo instalado.

Em síntese, o presente trabalho permite concluir que o óleo essencial de *R. officinalis* apresenta potencial terapêutico como fungicida no tratamento tópico de dermatofitoses, quando utilizada em concentrações não superiores a 0,64  $\mu\text{L/mL}$ . Adicionalmente, o óleo essencial poderá ser utilizado como um antioxidante natural na preservação dos alimentos, sendo a sua aplicação por via oral segura para concentrações inferiores a 0,32  $\mu\text{L/mL}$ .

**V- Trabalhos futuros**



O *Rosmarinus officinalis*, largamente distribuído no centro e sul de Portugal, é uma planta com uma vasta utilização na gastronomia Portuguesa. No presente trabalho o óleo essencial demonstrou ter potencialidades terapêuticas no tratamento de dermatofitoses, bem como atividade antioxidante, com interesse na preservação dos alimentos. Porém não apresentou atividade anti-inflamatória, pelo que seria interessante:

- Avaliar a atividade anti-inflamatória noutros modelos celulares e testar o seu efeito noutros mediadores inflamatórios;
- Testar a bioatividade dos compostos isolados do óleo essencial;
- Avaliar a citotoxicidade noutras linhas celulares.



## **VI- Referências bibliográficas**





- Amaral, G. P., Carvalho, N. R., Barcelos, R. P., Dobrachinski, F., Portella, R. D. L., Silva, M. H., (2013). Protective action of ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* L. in gastric ulcer prevention induced by ethanol in rats. An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association. *Food and Chemical Toxicology*, 55, 48-55.
- Ames, B.N., (1983). Dietary carcinogens and anticarcinogens oxygen radicals and degenerative diseases. *Science* 221,1256-1264.
- Anonymus. (1993). Some naturally occurring substances: heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *food items and constituents*, 56, 245.
- Anaissie, E.J., Vartivarian, S.E., Abi-Said, D., Uzun, O., Pinczowski, H., Kontoyiannis. D.P., Khoury, P., Papadakis, K., Bodey, G.P. (1996). Fluconazole versus Amphotericin B in the treatment of hematogenous candidiasis: a matched cohort study. *The American Journal of Medicine*, 101,170-176.
- Antunes, T., Sivate-Pinto, I., Barroso, J. G., Cavaleiro, C., Salgueiro, L. R. (2004). Micromorphology of trichomes and composition of essential oil of *Teucrium capitatum*. *Flavour and Fragrance Journal*, 19 (4), 336-340.
- Babovic, N., Djilas, S., Jadranin, M., Vajs, V., Ivanovic, J., Petrovic, S. (2010). Supercritical carbon dioxide extraction of antioxidant fractions from selected Lamiaceae herbs and their antioxidant capacity. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(1), 98-107.
- Baardseth, P. (1989). Effect of selected antioxidants on the stability of dehydrated mashed potatoes. *Food Addit. Contam.*, 6, 201-207.
- Bennett, J.W., & Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16, 497-516.
- Barreto, H.M. Filho, E.C.S., Lima, E.O. Coutinho, H.D.M., Morais-Braga, M.F.B., Tavares, C.C.A., Tintino, S.R., Rego, J.V., Abreu, A.P.L., Lustosa, M.C.G., Oliveira, R.W.G., Citó, A.M.G.L., Lopes, J.A.D. Chemical composition and possible use as adjuvant of the

## VI. Referências bibliográficas

antibiotictherapy of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L.. *Industrial Crops and Products*, 59, 290-294.

Bassalé, J.R.N., Juliani, H.R., (2012). Essencial oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*, 3989-4006.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008). Biological effects of essencial oils - A review. *Food and chiminal Toxicology*, 46, 446-475.

Bergold, A.M., Georgiadis, S. (2004). New antifungic drugs: a review. *Visão Acadêmica*. 5 (2), 159-172.

Beretta, G., Artali, R., Facino, M.R., Gelmini, F. (2011). An analytical and theoretical approach for the profiling of the antioxidante activity of essencial oils: The case of *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 55, 1255-1264.

Buchbauer, G. e Baser, K. H. C. (2010). Essential oils. Science Technology, and Applications. Cap. 3-6, pg. 39- 15. United States of America.

Burt, S. (2004). Essencial oils: their antibacterial properties and potencial applications in foods – a reviw. *International Journal of food Microbiology*, 94 (3), 223-253.

Brooks, G.F., Carroll, K.C., Butel, J.S., Morse, S.A., Mietzner, T.A. (2012). Microbiologia Médica de Jawets, Melnick e Adelberg. AMGH Editora Ltda. Porto-Alegre, Brasil.

Brückner, K., Božić, D., Manzan, D., Papaefthimiou, D., Pateraki, I., Scheler, U., Ferrer, A., Ric, C.H., Kanellis, A.K., Tissier, A. (2014). Characterization of two genes for the biosynthesis of abietane-type diterpenes in rosemary (*Rosmarinus officinalis*) glandular trichomes. *Phytochemistry*, 10, 52-64.

Borneo, R., León, A.E., Aguirre, A., Ribotta, P., Cantero, J.J. (2009). Antioxidant capacity of medicinal plants from the Province of Córdoba (Argentina) and their *in vitro* testing in a model food system. *Food Chemistry*, 112, 664-670.

- Cabral, C. (2013). Multidisciplinary taxonomic revision in the genus *Vitex* L. in Africa. PhD thesis. Lambert Academic Publishing. pp.61-79. University of Coimbra, Portugal.
- CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute, (2008a) - Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; *Approved standard-Third edition M27-A3*. 28, 14.
- CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute, (2008b) - Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; *Third informational supplement M27-S3*. 28, 15.
- CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute, (2012) - Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that grow Aerobically. *Approved Standart – Ninth Edition*. CLSI document M07-A9, Wane, Pennsylvania, USA.
- Cobellis, G., Acuti, G., Forte, C., Menghini, L., Vincenzi, S.D., Orrù, M., Valiani, A., Pacetti, D., Trabalza-Marinucci, M. (2015). Use of *Rosmarinus officinalis* in sheep diet formulations: Effects on ruminal fermentation, microbial numbers and in situ degradability. *Small Ruminant Reseach*, 126, 10-18.
- Costa, D. C., Costa, H.S., Albuquerque, T. G., Romos, F., Castilho, M. C., Sanches Silva, A. (2015). Advances in phenolic compounds analysis of aromatic plants and their potential applications. *Trends in food Science & Technology*, 1-19.
- Costa, G., Francisco, V., Lopes, M.C., Cruz, M.T. and Batista, M.T. (2012). Intracellular signaling pathways modulated by phenolic compounds: application for new anti-inflammatory drugs disco-very. *Current Medicinal*, 19, 2876-900.
- Cunha, P.A., Cavaleiro, C., Salgueiro, L. (2009). Fármacos aromáticos (Plantas aromáticas e óleos essenciais). Fundação Calouste Gulbenkian. *Farmacognosia e Fitoquímica*, Lisboa, pg. 470.

## VI. Referências bibliográficas

- Cunha, P.A., Ribeiro, J., Roque, O. (2007). Plantas aromáticas em Portugal. Caracterização e Utilizações. Fundação Calouste Gulbenkian. *Farmacognosia e Fitoquímica*, Lisboa, p. 328.
- Cunha, P.A., Roque, O., Nogueira, M. (2012). Plantas Aromáticas e óleos essenciais. Composição e aplicações. Fundação Calouste Gulbenkian. *Farmacognosia e Fitoquímica*, Lisboa, p. 678.
- Cunha, P.A., Roque, O., Gaspar, N. (2011). Cultura e Utilizações das Plantas Medicinais e Aromaticas. Fundação Calouste Gulbenkian. *Farmacognosia e Fitoquímica*, Lisboa, p. 472.
- Cunha, P.A., Cavaleiro, C., Salgueiro, L. (2010). Fármacos Aromaticos e óleos essenciais. Fundação Calouste Gulbenkian. *Farmacognosia e Fitoquímica*, Lisboa, p. 670.
- Cruz, T. M., Duarte, C., Gonçalo, M., Figueiredo, A. Carvalho, A. and Lopes, C. (2001) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor activates the transcription of nuclear factor kappa B and induces the expression of nitric oxide synthase in a skin dendritic cell line. *Immunology and Cell Biology*, 79, 590-596.
- Darshan, S. e Doreswamy, R. (2004). Patented antiinflammatory plant drug development from traditional medicine. *Phytotherapy Research: PTR*, 18 (5), 343-357.
- Dong, H., Zhang, Q., Li, J., Shen, L., Li, H., Qin, W. (2015). Antioxidant activity and Chemical composition of essential oil and ethanol extract of *Chuanminshen violaceum*. *Industrial Crops and products*, 76, 290-297.
- Dorman, H. J. D., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Deans, S.G., (2000). *In vitro* evaluation of antioxidant activity of essential oils and their components. *Flavour Fragrance J.* 15, 12-16.
- Eridis, A. E. (2007). Pharmaceutical and Therapeutic Potential of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents. *Phytotherapy Research*, 21, 308-323.

- Essawi, T., e Srour, M. (2000). Screening of some Palestinan medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of Etnofarmacology*, 70, 343-349.
- Farmacopeia Portuguesa. (2005). *Farmacopeia portuguesa*, 8 ed., infarmed, Lisboa.
- Figueiredo, A., Barroso, J. G., Pedro, L. G. (2007). Plantas aromáticas e medicinais. Fatores que afetam a produção. In A.C. Figueiredo, J.G. Barroso, L.G.Pedro, eds. *Potencialidades e aplicações das plantas aromáticas e medicinais*. 3rd ed., pp. 1-18. 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 (29), 3120-3140.
- Francisco, V., Figueirinha, A., Neves, B.M: Garcia-Rodriguez, C., Lopes, M.C., Cruz, M.T: and Batista, M.T. (2011) *Cymbopogon citratus* as source of new and safe anti-inflammatory drugs: Bio-guided assay using lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*, 133, 818-827.
- Fudjihara, M., Muroi, M., Tanamoto, K., Suzuki, T., Ikeda, H., Azuma, H. (2003). Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. *Pharmacology & Therapeutics*, 100, 171-194.
- Friedman, M., Henika, P.R., Mandrell, R.E. (2002). Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenese*, and *Salmonella enterica*. *Journal Food Protection*, 65, 1545-1560.
- Gacchkar L., Yadegari, D. Mohammad, B.R., Taghizadeh, M., Astaneh, S.A., Rasooli, I. (2007). Chemical and Biological Charateristics of *Cuminum Cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chemistry*, 102, 898-904.
- Gonçalves, M. J., Tavares, A. C., Cavaleiro, C., Cruz, T. M. Lopes, M. C., Canhoto, J. and Salgueiro, L. (2012). Composition, antifungal activity and cytotoxicity of the essential

## VI. Referências bibliográficas

oils of *Seseli tortuosum* L. and *Seseli montanum* subsp. *peixotoanum* (Samp.) M. Lainz from Portugal. *Industrial Crops and Products*, 39, 204-209.

Gould, GW (2001) - New processing Technologies; an overview. *Proceedings of the Nutrition Society*, 60, 463-474.

Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R., (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, 126, 131-138.

Holmes, P. (1999). Rosemary oil. *The International Journal of Aromatherapy*, 9 (2), 62-66.

Ito, N., Hagiwara, A., Shibata, M., Ogiso, T., Fukushima, S. (1982). Induction of squamous cell carcinoma in the forestomach of F344 rats treated with butylated hydroxyanisole. *Gann*, 73, 332-334.

Jalali-Heravi, M., Moazeni, R.S. Sereshti H. (2011) Analysis of Iranian rosemary essential oil: application of gas chromatography- mass spectrometry combined with chemometrics. *Journal Chromatography*, 12 (18), 2569-2576.

Juhás, S., Bukovská, A., Čikoš, S., Czikková, S., Fabian, D., Koppel, J. (2009). Anti-Inflammatory Effects of *Rosmarinus officinalis* Essential Oil in Mice. *ACTA VET. BRNO*, 78, 121-127.

Jiang, Y., Wu, N., Fu, Y.J., Wang, W., Luo, M., Zhao, C.J., Zu, Y.G., Liu, X.L. (2011). Chemicals composition and antimicrobial activity of essential oil of Rosemary. *Environ. Toxicol. Pharm.*, 32, 63-68.

Jordán, M.J., Lax, V., R.C., Lorán, S., Sotomayor, J. (2013). Effect of bioclimatic area on the essential oil composition and antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L. *Food control Food Control*, 30, 463-468.

- Kim, H., Lee, B. e Yun, K. W. (2013). Comparison of chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from three Pinus species. *Industrial Crops and Products*. 44: 323-329.
- Kiran, S., Prakash, B. (2015). Toxicity and biochemical efficacy of chemically characterized *Rosmarinus officinalis* essential oil against *Sitophilus oryzae* and *Oryzaephilus surinamensis*. *Industrial Crops and Products*, 74, 817-823.
- Llana-Ruiz-Cabello, M., Pichardo, S., Maisanaba, S., Puerto, M., Prieto, A. I., Guitiérrez-Praena, D., Jos, A., Cameán, A. M. (2015). *In vitro* toxicological evaluation of essential oils and their main compounds used in active food packaging: A review. *Food and Chemical Toxicology*, 81, 9-27.
- Lahlou, M. 2004. *Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils*. *Phytotherapy Research*. 18:435-448.
- Lindley, M.G. (1998). The impact of food processing on antioxidants in vegetable oils, fruits and vegetables. *Food Science & Technology*, 9, 336-340.
- Lopez-Malo A, SM Alzamora, E Palou (2002) - *Aspergillus flavus* dose-response curves to selected natural and synthetic antimicrobials. *International Journal of Food Microbiology*, 73, 213-218.
- Lourenço, J. A. (2007). Destilação industrial de óleos essenciais. Curso técnico o prático. pg. 80-82.
- Mata, A.T., Proença, C., Ferreira, A.R., Serralheiro, M.L.M. Nogueira, J.M.F., Araújo, M.E.M. (2007). Antioxidant and antia cetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food chemistry*, 103, 778-786.
- Madsen, H. L., e Bertelsen, G. (1995). Spices as antioxidants. *Trends in Food Science and Technology*, 6, 271-277.

## VI. Referências bibliográficas

- Madsen, H.L., Nielson, B.R., Bertelson, G., Skibsted, L.H. (1995). Screening of antioxidative activity of spices. A comparison between assays based on ESR spin trapping and electrochemical measurement of oxygen consumption. *Food Chemistry*, 2 (57), 331-337.
- Miguel G.M. (2010). Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils: A Short Review. *Molecules*, 15 (12), 9252-87.
- Mishra, P.K., Singh, P., Prakash, B., Kedia, A., Dubey, N.K., Chanotiya, C.S. (2013). Assessing essential oil components as plant-based preservatives against fungi that deteriorate herbal raw materials. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 80, 16-2.
- Morales, C.R., Pedrozo, Z., Lavandero, S., Hill, J.A. (2014). Oxidative stress and autophagy in cardiovascular homeostasis. *Antioxd. Redox. Signal*, 20, 507-518.
- Morales, R.. *Rosmariuns officinalis* L.. *Discrição na flora Íberica*. Pg. 328.
- Mosman, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*. 65: 55-63.
- Ngo, S.N., Williams, D.B., Head, R.J., 2011. Rosemary and cancer prevention:preclinical perspectives. *Crit. Rev. Food Science & Nutrition*, 51, 946-954.
- Nikaido, H. (2009). Multidrug resistance in bactéria. *AnnualReview of Biochemistry*, 78, 119-146.
- Novak, J., Bitsch, C., Langbehn, J., Pank, F., Skoula, M., Gotsiou, Y. (2000). Ratios of cisandtrans-sabinene hydrate in *Origanum majorana* L. and *Origanum microphyllum*. *Biochemistry Systems Ecology*, 28, 697-704.
- Ohnishi, K., Komohara, Y., Fujiwara, Y., Takemura, K., Lei, X., Nakagawa, T., Sakashita, N. and Takeya, M. (2011). Suppression of TLR4-mediated inflammatory response by macrophage class scavenger receptor (CD204). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 411, 516-522.



- Ojeda-Sana AM, van Baren CM, Elechosa MA, Juárez MA, Moreno S: New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components. *Food Control*, 2013, 31:189-195.
- Osman, K.A., Abdulrahman, H.T. (2003). Risk assessment of pesticide to human and the environment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 10, 81-106.
- Pandey, V.C., Singh, N. (2015). Aromatic plants versus arsenic hazards in soils. *Journal of Geochemical exploration*, 157, 77-80.
- 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. *Medicinal Chemistry*, 9, 1292-1305.
- Passone, M. A., Girardi, N. S., Etcheverry, M. (2013). Antifungal and antiaflatoxigenic activity by vapor contact of three essential oils and effects of environmental factors on their efficacy. *Food Science and Technology*, 53, 434-444.
- Peter, K. V. (2004). Introduction to herbs and spices. In K. V. Peter (Ed.), *Handbook of herbs and spices*.
- Pin-Der, D. e Gow-Chin, Y. (1997). Antioxidant efficacy of methanolic extracts of peanut hulls in soybean and peanut oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74 (6), 745-748.
- 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, 1367-1373.
- Pourmortazavi, S.M. e Hajimirsadeghi, S.S. (2007). Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *J. Chromatogr. A*, 1163, 2-24.

## VI. Referências bibliográficas

- Prakash, B., Shukla, R., Singh, P., Mishra, P. K., Dubey, N. K., Kharwar, R. N. (2011). Efficacy of chemically characterized *Ocimum gratissimum* L. essential oil as an antioxidant and a safe plant based antimicrobial against fungal and aflatoxin B1 contamination of spices. *Food Research International*, 44, 385-390.
- Praskash, B., Mishra, P.K., Kedia, A. Dubey, N.K. (2014) Antifungal, antiaflatoxin and antioxidant potential of chemically characterized *Boswellia carterii* Birdw essential oil and its in vivo practical applicability in preservation of *Piper nigrum* L. fruits. *Food Science and Technology*, 56, 240-257.
- Prakash, B., Singh, P., Kedia, A., Dubey, N.K. (2012). Assessment of some essential oils as food preservatives based on antifungal, antiaflatoxin, antioxidant activities and in vivo efficacy in food system. *Food Research International*, 49, 201-208.
- Reicheling, J., Schnitzler, P., Suschke, U., Saller, R. (2009). Essencial oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties-na overview. *Forschende Komplementarmedizin*, 16 (2), 79-90.
- Raetz, Christian R. H. (1990). Biochemistry of Endotoxins. *Annual Review of Biochemistry* 59: 129-170.
- Rašković, A., Milanović, I., Pavlović, N., Čebović, T., Vukmirović, S. and Mikov, M. (2014). Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil and its hepatoprotective potential. *BMC. Complementary & Alternative Medicine*, 14, 1-9.
- Ribeiro-Santos, R., Carvalho-Costa, D., Cavaleiro, Costa, H.S., Albuquerque, T.G., Castilho, M.C., Ramos, F., Nathália, R.M., Sanches-Silva, A. (2015). A novel insight on na ancient aromatic plant: The rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Trends in Food Science & Technology*, 1-14.
- Roby, M. H. H., Sarhan, M. A., Selim, A. K., Khalel K. I., (2013). Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris*L.), sage (*Salvia*

- officinalis*L.), and marjoram (*Origanum majorana*L.) extracts. *Industrial Crops and products*, 43, 827-831.
- Rubert, J., Soler, C., e Manes, J. (2012). Application of an HPLC-MS/MS method for mycotoxin analysis in commercial baby foods. *Food Chemistry*, 133, 176-183.
- Rubiolo, P., Sgorbini, B., Liberto, E., Cordero, C., Bicchi, C. (2010). Essential oils and volatiles: sample preparation and analysis. *Flavour Fragrance Journal*, 25, 282-290.
- Salgueiro, L. (1994). *Os tomilhos portugueses e os seus óleos essenciais*. Tese de Doutoramento. Universidade de Coimbra.
- Salido S., Altarejos J., Nogueras M., Sanchez A., Luge P. (2003). Chemical composition and seasonal variations of rosemary oil from southern Spain. *J. Essen. Oil Res*, 15, 10-14.
- Sedighi, R., Zhao, Y., Yerke, A., Sang, S. (2015). Preventive properties of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) in obesity and diabetes mellitus of metabolic disorders: a brief review. *Food science*, 2, 58-70.
- Serrano, E., Palma, J., Tinoco, T., Venâncio, F., Martins, A. (2002). Evaluation of the Essential Oils of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) from Different Zones of "Alentejo (Portugal)". *J. Essent. Oil Res.*, 14, 87-92.
- Sherwood, E.R. e Toliver-Kinsky, T. (2004). Mechanisms of the inflammatory response. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*, 18, 385-405.
- Shukla, R., Kumar, A., Singh, P., & Dubey, N. K. (2009). Efficacy of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. Essential oil and its monoterpene aldehyde constituents against fungi isolated from some edible legume seeds and aflatoxin B1 production. *International Journal of Food Microbiology*, 135, 165-170.
- Silveira e Sá, R., Andrade, L., Oliveira, R., Sousa, D. (2014). A review on anti-inflammatory activity of Phenylpropanoids found in essential oils. *Molecules*, 19 (2), 1459-80.

## VI. Referências bibliográficas

- Sinha, S., Jothiramajayam, M., Ghosh, M., Anita, M. (2014). Evaluation of toxicity of essential oils palmaros, citronela, lemongrass and vetiver in human lymphocytes. *Food and Chimical Toxicology*, 68, 71-77.
- Sousa, L.L., Andrade, S.C.A., Athayde, A.J.A.A., Oliveira, C.E.V., Sales, C.V. (2013). Efficacy of *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. essential oils in combination to control posthogenic *Aspergilli* and autochthous mycoflora in *Vitis labrusca* L. (tables grapes). *International Jornal of Food Microbial*, 165, 312-318.
- Sosa, V., Moliné, T., Somoza, R., Pacci, R., Kondoh, H., Leonart, M.E. (2013). Oxidative stress and cancer: a review. *Ageing Research Reviews*, 12, 376-390.
- Szumny, A., Figiel, A., Guti\_errez-Ortíz, A., & Carbonell-Barrachina, A. A. (2010).Composition of rosemary essential oil (*Rosmarinus officinalis*) as affected bydrying method. *Journal of Food Engineering*, 97 (2), 253-260.
- Stuehr, D. J. e Marletta, M.A. (1985). Mammalian nitrate biosynthesis: Mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Medical Sciences*, 82, 7738-7742.
- Tanikawa, K. e Torimura, T. (2006). Studies on oxidative stress in liver diseases: importante future trends in liver research. *Med Mol Morphol*, 39, 22-27.
- Tavassoli, S.K., Mousavi, S.M., Emam-Djomeh, Z., Razavi, S.H. (2011). Chemical composition and antimicrobial properties of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil. *Afr. J. Biotechnol*, 10, 13895-13899.
- Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Neng, N. R., Nogueira, J. M. F., Saraiva, J. A., (2013). Chemical composition and antibacterial and antioxida properties ofcommercial essential oils. *Industrial Crops and Products*, 43, 587-595.

- Varela, F., Navarrete, P., Cristobal, R., Fanlo, M., Melero, R., Sotomayor, J.A., Jordán, M.J., Cabot, P., Sánchez de Ron, D., Calvo, R., Cases, A. (2009). Variability in the chemical composition of wild *Rosmarinus officinalis* L. *Research Gate*, 1-7.
- Verma, S.K., Singh, K., Gupta, A.K., Pandey, V.C., Trevedi, P., Verma, S.K., Patra, D.D. (2014). Aromatic grasses for phytomanagement of coal fly ash harards. *Ecol. Eng.*, 73, 425-428.
- Wang, W., Wu, N., Zu, Y.G., Fu, Y.G. (2008). Antioxidante activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil comparad to its main componentes. *Food Chemestry*, 108, 1019-1022.
- Yanishlieva, N.V., Marinova, E., Pokorny, J., 2006. Natural antioxidants from herbsand spices. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 108, 776-793.
- Zaouali, Y., Bouzaine,T., Boussaid, M. (2010). Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidantactivities. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 3144-3152.
- Zegura, B., Dobnik, D., Niderl, M. H., Filipic,M. (2011). Antioxidant and antigenotoxic effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extracts in *Salmonella typhimurium*TA98 and HepG2 cells. *Environmental toxicology and pharmacology*, 32, 296-305.
- Zeng, W.C., Zhu, R.X., Jia, L.R., Gao, H., Zheng, Y., Sun, Q. (2011). Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of essential oil from *Gnaphlium affine*. *Food na Chemical Toxicology*, 49, 1322-1328.
- Zhang, A., Sun, H., Wang, X. (2013) Recent advances in natural products from plants for treatment of liver diseases. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 63, 570-577.
- Zhu, J. Lou, C., Wang, P., Hie, Q., Zhou, J. and Peng, H. (2013). Saikosaponin A mediates the inflammatory response by inhibiting the MAPK and NF-κB pathways in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 5, 1345-1350.

VI. Referências bibliográficas

Zhu R, Wang Y, Zhang, L., Guo, Q. (2012). Oxidative stress and liver disease. *Hepatology Research*, 42, 741-749.

Zuzarte, M., Gonçalves, M.J., Canhoto, J., Salgueiro, L. (2011). Antidermatophytic activity of essential oils. *Formatex*. 1167-1178.