



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Avaliação das potencialidades medicinais de
Thymus camphoratus Hoffmanns. &
Link. e *Thymus carnosus* Boiss.



Melissa Pereira Alves

2013



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Avaliação das potencialidades medicinais de *Thymus camphoratus* Hoffmanns. & Link. e *Thymus carnosus* Boiss.

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Lígia Maria Ribeiro Pires Salgueiro Silva Couto (Universidade de Coimbra) e do Professor Doutor António Xavier de Barros e Cunha Pereira Coutinho (Universidade de Coimbra).

Melissa Pereira Alves

2013

Capa: *Thymus camphoratus* Hoffmanns. e Link. (esquerda) e *Thymus carnosus* Boiss. (direita).
(adaptadas de flora-on.pt)

ORIENTADORES

Professora Doutora Lúgia Maria Ribeiro Pires Salgueiro Silva Couto

Faculdade de Farmácia

Universidade de Coimbra

Professor Doutor António Xavier de Barros e Cunha Pereira Coutinho

Departamento de Ciências da Vida

Universidade de Coimbra

É triste pensar que a natureza fala e o género humano não a ouve.

Victor Hugo

Aos meus pais

Ao meu irmão

Aos meus amigos

AGRADECIMENTOS

Ao longo deste estudo, foram várias as pessoas que me incentivaram e apoiaram, contribuindo de forma positiva para a sua concretização. Desta forma, expresso a minha gratidão a todos os que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

À Professora Doutora Lígia Salgueiro Couto, orientadora deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos pelo apoio, incentivo, disponibilidade e amizade, bem como os valiosos ensinamentos, que me prestou.

Ao Professor Doutor António Pereira Coutinho, co-orientador deste trabalho, agradeço a disponibilidade e boa disposição com que sempre me acolheu, assim como todos os esclarecimentos e ensinamentos prestados.

À Professora Doutora Maria José Gonçalves do Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia, o meu especial agradecimento por toda a paciência, compreensão e amizade que me prestou diariamente ao longo deste trabalho. Agradeço também todos os valiosos ensinamentos que me concedeu.

À Doutora Mónica Zuzarte, o meu muito obrigado pelos ensinamentos e apoio em algumas partes experimentais deste trabalho, bem como a revisão do trabalho escrito. Agradeço toda a paciência e amizade.

À Professora Doutora Isabel Luci Conceição, do Departamento de Ciências da Vida e coordenadora geral do Mestrado em Biologia, a minha gratidão pela ajuda e apoio em todos os aspetos formais e logísticos ao longo de todo o mestrado.

Ao Doutor Jorge Paiva, por me ter feito ver a área da botânica com outros olhos e me ter encaminhado para o mundo das plantas aromáticas e medicinais.

A todos os meus colegas de laboratório, um apreço especial por todos os momentos de amizade, companheirismo e boa disposição que me proporcionaram ao longo deste trabalho.

À bibliotecária do Instituto Botânico do Departamento de Ciências da Vida, agradeço a forma simpática e atenciosa com que sempre me acolheu aquando a realização escrita deste trabalho.

Aos meus familiares e amigos que me apoiaram incondicionalmente. Um agradecimento muito especial aos meus pais e irmão, que sem o constante apoio, incentivo, amizade, carinho e compreensão, este trabalho não seria possível.

Finalmente, desejo expressar a minha gratidão a todos quantos, aqui não mencionados, contribuíram de alguma forma para a concretização deste trabalho.

ÍNDICE

RESUMO.....	X
ABSTRACT	XII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIV
I: INTRODUÇÃO	1
1. Plantas Aromáticas e Medicinais.....	2
2. Óleos Essenciais	3
2.1. Características gerais.....	3
2.2. Produção e Armazenamento.....	4
2.3. Métodos de extração.....	5
2.4. Processos analíticos.....	7
2.5. Atividade biológica e importância económica	8
3. O Género <i>Thymus</i>	8
3.1. <i>Thymus camphoratus</i> Hoffmanns. & Link.....	10
3.2. <i>Thymus carnosus</i> Boiss.	14
4. Objetivos.....	17
II: ATIVIDADE ANTIFÚNGICA	18
1. Introdução.....	19
1.1. Candidíase	19
1.2. Criptococose.....	21
1.3. Aspergilose.....	21
1.4. Dermatofitose	22
1.5. Antifúngicos sintéticos	23
1.6. Objetivos	24
2. Materiais e Métodos	24

2.1.	Óleos essenciais e compostos puros testados.....	25
2.2.	Estirpes fúngicas testadas.....	26
2.3.	Atividade Antifúngica.....	26
2.4.	Inibição do tubo germinativo.....	27
3.	Resultados.....	28
3.1.	Atividade antifúngica.....	28
3.2.	Inibição do tubo germinativo.....	32
4.	Discussão.....	32
III: ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA.....		36
1.	Introdução.....	37
2.	Materiais e Métodos.....	38
2.1.	Óleos Essenciais.....	38
2.2.	Materiais e Cultura celular.....	38
2.3.	Metodologia.....	39
2.3.1.	Produção de Nitritos.....	39
2.3.2.	Viabilidade Celular.....	40
2.4.	Análise Estatística.....	41
3.	Resultados.....	42
3.1.	<i>Thymus camphoratus</i> – 1.....	42
3.2.	<i>Thymus camphoratus</i> – 2.....	44
3.3.	<i>Thymus carnosus</i>	45
4.	Discussão.....	47
IV: CONCLUSÕES.....		49
V: PERSPETIVAS FUTURAS.....		51
VI: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		53

RESUMO

O género *Thymus* L. (tomilhos), inclui plantas aromáticas muito bem representadas em Portugal, pela sua importância na medicina popular, em culinária e ainda, industrialmente para a extração do óleo essencial. Considerando que vários estudos já evidenciaram o potencial bioativo de diversas espécies do género *Thymus* L., considera-se importante ampliar essa investigação a outras espécies menos conhecidas de forma a viabilizar a sua utilização na constituição de alternativas terapêuticas.

O presente trabalho visa a valorização das espécies *Thymus camphoratus* Hoffmanns. & Link. e *Thymus carnosus* Boiss., pela avaliação do potencial antifúngico e anti-inflamatório, bem como a citotoxicidade dos seus óleos essenciais. Para essa análise, foram utilizadas amostras de óleos essenciais de diferentes pontos geográficos.

Para avaliar a atividade antifúngica dos óleos essenciais e dos seus compostos maioritários, analisou-se o seu efeito contra diversas estirpes de leveduras e fungos filamentosos, nomeadamente *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* spp. e dermatófitos (*Trichophyton* spp., *Microsporum* spp. e *Epidermophyton* sp.). Os resultados evidenciaram propriedades antifúngicas contra as diferentes estirpes, destacando-se a atividade dos óleos contra *C. neoformans*, com valores de MIC e MLC de 0,16 e 0,32 $\mu\text{L mL}^{-1}$, respectivamente. Em relação às restantes estirpes estudadas, os óleos de *T. camphoratus* foram mais efetivos contra as estirpes de dermatófitos do que o óleo de *T. carnosus*, com valores de MIC e MLC de 0,64 a 1,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$.

Em análise da inibição do crescimento do tubo germinativo de *C. albicans*, todos os óleos apresentaram ser efetivos. Considerando que a formação do tubo germinativo é um fator importante de patogenicidade na invasão de tecidos, o facto dos óleos essenciais inibirem a sua formação, torna-os potenciais agentes terapêuticos, principalmente para o tratamento de candidíase disseminativa.

A avaliação do potencial anti-inflamatório e a citotoxicidade dos óleos essenciais foram realizadas num modelo *in vitro* de inflamação, nomeadamente uma linha celular de macrófagos de rato Raw 264.7, estimulados por lipopolissacarídeo bacteriano (LPS). O potencial anti-inflamatório foi quantificado de acordo com a produção de óxido nítrico (NO), um importante mediador pró-inflamatório. Paralelamente, o efeito dos óleos na viabilidade celular foi determinado usando o método do MTT. Os resultados

evidenciaram que os óleos essenciais de *T. camphoratus* 1 e *T. carnosus* foram os mais eficazes, apresentando atividade anti-inflamatória a concentrações de 0,32 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (*T. camphoratus* 1) e de 0,32 e 0,64 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (*T. carnosus*) sem risco de toxicidade para as células. Assim, este óleo pode ser considerado um eventual candidato a agente anti-inflamatório.

Palavras-chave: *Thymus* spp; *Candida* spp.; tubo germinativo; leveduras; fungos filamentosos; óxido nítrico; citotoxicidade.

ABSTRACT

The genus *Thymus* L. (thyme), comprises species of aromatic plants well represented in Portugal due to its importance in traditional medicine, in culinary and for industrial extraction of essential oils. Considering that several studies have demonstrated the bioactive potential of some *Thymus* species, we now intend to focus the research on less known species in order to enable and simplify their use in the development of new alternative therapies.

Therefore, the present work aims the valorization of *Thymus camphoratus* Hoffmanns. & Link. and *Thymus carnosus* Boiss. species by studying the antifungal and anti-inflammatory potential as well as the cytotoxicity of their essential oils. For this study, different samples of essential oils from different geographical points were used.

The antifungal activity of the essential oils and their main compounds, was evaluated against several strains of yeasts and filamentous fungi, such as *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* spp. and dermatophytes (*Trichophyton* spp., *Microsporum* spp. and *Epidermophyton* sp). The results showed antifungal activity against the different strains, standing out the activity against *C. neoformans*, with MIC and MLC values of 0.16 and 0.32 $\mu\text{L mL}^{-1}$, respectively. Regarding the other strains, the *T. camphoratus* oils were more effective than *T. carnosus* oil against dermatophyte strains, with values of MIC and MLC ranging from 0.64 to 1.25 $\mu\text{L mL}^{-1}$.

All the oils tested were effective on the inhibition of *C. albicans* germ tube. Considering that the germ tube formation is an important pathogenic factor in the invasion of tissues, the inhibition by essential oils makes them good therapeutic agents, mainly for the treatment of disseminative candidosis.

The evaluation of the anti-inflammatory potential and the cytotoxicity of essential oils were performed on an *in vitro* inflammation model using mouse RAW 264.7 macrophages stimulated by LPS. The anti-inflammatory potential was quantified according to nitric oxide (NO) production, an important pro-inflammatory mediator. Also, the effect of the essential oils on the cellular viability was evaluated using the MTT method. The results showed the *T. camphoratus* 1 and *T. carnosus* were the most effective, showing anti-inflammatory effects at 0.32 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (*T. camphoratus* 1) and

0.32 and 0.64 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (*T. carnosus*) without any toxicity risk for the cells. Therefore, these oils may be considered in the future development of anti-inflammatory agents.

Keywords: *Thymus* spp; *Candida* spp.; germ tube; yeasts; filamentous fungi; nitric oxide; cytotoxicity.

LISTA DE ABREVIATURAS

- APG III – Angiosperm Phylogeny Group - III
- ATCC – American Type Culture Collection
- CECT – Colección Española de Cultivos Tipo
- CGL – Cromatografia de gás-líquido
- CGL/MS – Cromatografia gás-líquido associada à Espectrometria de massa
- CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute.
- COX-2 – Cicloxigenase induzida
- DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium
- DMSO – Dimetil Sulfóxido
- iNOS – Óxido Nítrico-sintase induzida
- ISO/CT5 – Instituto Português da Qualidade – Comissão Técnica 5
- ISO/TC54 – International Standards Organization - Technical Committee 54
- LPS – Lipopolissacarídeo
- mL - mililitro
- MIC – Concentração Mínima Inibitória
- MLC – Concentração Mínima Letal
- MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
- MW 48 – microplaca de 48 poços
- NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards
- NO – Óxido Nítrico
- NP – Norma Portuguesa
- NYP – meio de cultura - N-acetilglucosamine, Yeast Nitrogen Base, Proline
- PGE₂ – Prostagladina E₂
- p/v – peso/volume
- T1 – *Thymus camphoratus* amostra 1
- T2 – *Thymus camphoratus* amostra 2
- Tc – *Thymus carnosus*
- UV-B – Radiação ultravioleta responsável pelos danos às células
- v/v – volume/volume
- µg – micrograma
- µL – microlitro

I: INTRODUÇÃO

1. Plantas Aromáticas e Medicinais

A utilização das plantas aromáticas e medicinais é tão antiga como a própria humanidade. Desde os primórdios que se utilizam plantas silvestres e cultivadas para fins alimentares, medicinais, religiosos, entre outros.

A nível global, cerca de 12,5% (\pm 52.000 espécies) das plantas vasculares são utilizadas para fins medicinais, e apenas cerca de 0,5% destas foram investigadas (Joy *et al*, 1998; Raikhel, 2003; Shasany *et al*, 2007). Embora haja uma grande procura de plantas medicinais e aromáticas, o seu cultivo e produção comercial não passa de poucas centenas de espécies, sendo que a maioria são provenientes de colheitas espontâneas (Raikhel, 2003). Estes factos têm como consequência a agravante de algumas populações e habitats de plantas medicinais e aromáticas se encontrarem ameaçados, pois a sua procura aumentou, a colheita nem sempre é feita de forma sustentável, e algumas das espécies são endemismos, por vezes com nichos ecológicos muito vulneráveis (Figueiredo *et al*, 2007).

Portugal é uma fonte de potencialidades naturais, cuja flora é muito rica em plantas aromáticas e medicinais, não só por ter um clima predominantemente mediterrânico, como também pela sua localização geográfica (Salgueiro, 1994). Das 3994 espécies que compõem a cobertura vegetal do Continente, Açores e Madeira (Crespí *et al*, 2011), cerca de 500 são consideradas aromáticas e/ou medicinais (Figueiredo *et al*, 2007). Assim, torna-se importante avaliar o potencial bioativo das plantas medicinais e aromáticas da flora portuguesa bem como a sua viabilidade de utilização, de modo a constituírem alternativas terapêuticas.

De uma forma genérica, consideram-se como plantas aromáticas e medicinais todas aquelas que contenham num ou mais dos seus órgãos óleos essenciais, e que sejam usadas pelas suas propriedades medicinais.

Na atualidade, os avanços da química de síntese permitem desenvolver novos medicamentos de forma rápida e eficaz, mas, mesmo assim, a utilização de plantas medicinais e produtos derivados tem vindo a aumentar por todo o globo, assim como o interesse científico nos seus constituintes (Proença da Cunha *et al*, 2009). Um progresso notável no desenvolvimento de métodos analíticos também tem contribuído para uma caracterização mais precisa e fiável dos metabolitos das plantas (Philipson, 2007).

As plantas, para além dos seus metabolitos primários envolvidos nos processos essenciais de sobrevivência como a respiração ou a fotossíntese, produzem metabolitos secundários, com vias metabólicas próprias, que estão ligados a processos de defesa e sinalização (Seigler, 1998; Van der Fits e Memelink, 2000). Os compostos das plantas com maiores atividades biológicas são geralmente compostos do metabolismo secundário (Brito, 1996) que se incluem em três grupos principais: terpenóides, compostos fenólicos e alcalóides (Verpoorte e Alfermann, 2000; Dixon, 2001; Taiz e Zeiger, 2002). Particularmente nas últimas décadas, foi avaliado o potencial destes compostos em atividades biológicas específicas, como antioxidantes, antibacterianas, antifúngicas, antivirais, entre outras (Verpoorte e Alfermann, 2000; Celikel e Kavas, 2008).

2. Óleos Essenciais

2.1. Características gerais

Nas plantas aromáticas e medicinais muitas das suas propriedades terapêuticas devem-se parcialmente aos seus óleos essenciais (Edris, 2007). Estas substâncias são frequentemente conhecidas como produtos “aromáticos”, apenas pelas suas qualidades odoríferas e não pela estrutura química dos seus constituintes, pois a maior parte das vezes a sua estrutura não é a dos compostos cíclicos trietilénicos, isto é, com um anel benzénico (aromático) (Salgueiro, 1994). Os óleos são constituídos por uma mistura de compostos voláteis, arrastáveis pelo vapor de água, muito pouco solúveis em água e solúveis em solventes orgânicos, de baixo peso molecular e dotados de aroma. Encontram-se essencialmente em estruturas secretoras especializadas que podem estar presentes em todos os órgãos vegetais mas, normalmente, com maior predominância nas flores e folhas (Proença da Cunha *et al*, 2003). Têm uma constituição complexa que inclui vários compostos. Quimicamente os principais constituintes dos óleos pertencem a dois grandes grupos: terpenos (mono-, di- e sesqui-terpénicos) e derivados do fenilpropano, sendo estes últimos habitualmente menos frequentes (Proença da Cunha *et al*, 2003). Cada composto na sua proporção específica dá as características próprias a cada óleo essencial (Figueiredo *et al*, 2008b).

Existem diversos fatores intrínsecos (sexuais, sazonais, ontogénicos e genéticos) e extrínsecos (solo, luz, humidade, etc.) que influenciam a biossíntese dos óleos

essenciais, conferindo-lhes habitualmente uma elevada variabilidade química (Panizzi *et al*, 1993; Lahlou, 2004; Zuzarte, 2007). Assim, apesar de numa mesma população as plantas serem morfológicamente indiferenciadas e sexualmente compatíveis (mesma espécie), alguns indivíduos podem produzir óleos essenciais com composições químicas distintas. Na maioria das vezes, trata-se de diferenças quantitativas bastante acentuadas, que resultam da expressão de diferentes vias metabólicas devido a pequenas diferenças genéticas. Desta forma, é possível distinguir categorias químicas intra-específicas, denominadas quimiotipos ou variedades químicas com interesses particulares nos diversos *taxa* (Salgueiro, 1994).

2.2. Produção e Armazenamento

A produção e a acumulação dos óleos essenciais estão, geralmente, associadas a estruturas ou cavidades secretoras especializadas que podem localizar-se à superfície de órgãos vegetais, como os tricomas secretores e osmóforos, ou no interior de tecidos vegetais, como os idioblastos, canais e bolsas (Wagner, 1991; Gershenzon *et al*, 1992; Zuzarte, 2007). O tipo e a localização das estruturas secretoras são, normalmente, característicos da família a que pertencem (Zizovic *et al*, 2007), o que pode ajudar à identificação da autenticidade do material vegetal.

As cavidades secretoras são formadas por uma camada epitelial que rodeia uma cavidade central e os óleos essenciais são biossintetizados nos leucoplastos das células secretoras da camada epitelial e movem-se para a cavidade central via retículo endoplasmático (Svoboda *et al*, 2000).

Frequentemente, os óleos essenciais localizam-se em tecidos secretores epidérmicos denominados tricomas glandulares (Gershenzon *et al*, 1989). Estes têm origem numa célula da protoderme, que se distingue das células vizinhas por ser mais volumosa, apresentar um núcleo hipertrofiado e um citoplasma muito denso. Existem, predominantemente, dois tipos de tricomas glandulares: peltados e capitados, que se podem localizar nos caules, folhas e em diversas partes florais. Os tricomas capitados são constituídos por uma célula basal, um pedículo comprido, uni ou pluricelular e uma cabeça formada por uma ou duas células. Os tricomas peltados são formados por uma célula basal, um pedículo curto e uma cabeça com células secretoras organizadas numa

ou mais camadas (Werker *et al*, 1985; Werker *et al*, 1993; Bisio *et al*, 1999; Combrinck *et al*, 2007).

A estrutura e distribuição dos tricomas na superfície das plantas contribui para o controlo da transpiração e temperatura do órgão em que se encontram, bem como a proteção contra a radiação UV-B que resulta da exposição solar (Verpoorte e Alfermann, 2000; Combrinck *et al*, 2007). Estas estruturas podem também impedir a deflagração de pragas ou atrair insetos através da libertação de óleos essenciais envolvidos na polinização (Van der Fits e Memelink, 2000; Verpoorte e Alfermann, 2000; Combrinck *et al*, 2007).

A libertação dos óleos essenciais pode ocorrer de forma espontânea ou devido a fatores abióticos, como o aumento da temperatura, ou fatores bióticos, como a presença de predadores (Dixon, 2001; Zuzarte, 2007). Na presença de predadores, a libertação dos óleos essenciais, torna-se uma importantíssima barreira protetora. Isto porque a toxicidade de alguns dos constituintes dos óleos acaba por servir de repelente tanto a insetos como a herbívoros (Salgueiro, 1994). Por outro lado, os óleos também servem de obstáculo ao ataque microbiano, e participam em fenómenos de alelopatia inibindo a germinação e o crescimento de espécies competidoras (Salgueiro, 1994; Dixon, 2001).

As estruturas secretoras têm vindo a despertar o interesse dos taxonomistas, dado o seu valor taxonómico nalguns *taxa*. Nos últimos anos, foram realizados numerosos estudos contribuindo para o conhecimento da diferenciação e desenvolvimento destas estruturas, esclarecendo as suas funções fisiológicas e ecológicas e também elucidando das principais vias de síntese dos metabolitos produzidos (Fahn, 1988; Zuzarte, 2007).

2.3. Métodos de extração

Existem vários métodos para a extração de óleos essenciais e de outros extratos aromáticos das plantas. No entanto, de acordo com as normas da *International Standard Organization on Essential Oils*, ISO 9235 (1997) da ISO/TC 54 e da *Norma Portuguesa NP 90* (1987) do IPQ-CT5, reserva-se a designação de óleo essencial a produtos obtidos exclusivamente por destilação da matéria vegetal ou por processos mecânicos, a partir do epicarpo de frutos de espécies de *Citrus*. Desta forma, a destilação e a expressão são os processos de obtenção industrial dos óleos essenciais.

A destilação é um processo simples, de baixo custo e que se revela vantajosa por apenas arrastar os compostos voláteis. Todas as técnicas de destilação utilizam água e/ou vapor de água para facilitar a libertação dos óleos essenciais das estruturas vegetais. Durante o processo extrativo, o vapor de água arrasta os componentes voláteis que, após condensação, constituem uma fase oleosa imiscível em água, sendo o óleo essencial separado posteriormente por decantação. Para além do óleo essencial obtém-se no decurso da destilação uma água aromatizada, designada por hidrolato, constituída por uma pequena percentagem de constituintes do óleo que se solubilizaram na água (Proença da Cunha *et al*, 2007). Podem distinguir-se três técnicas de destilação: a destilação em água (hidrodestilação), a destilação em água com arrastamento de vapor e a destilação por arrastamento de vapor. A hidrodestilação é a técnica usada pela maioria dos investigadores e também pelas indústrias com menores dimensões, por requerer destiladores mais simples (Proença da Cunha, 2009).

A expressão, outro método de extração de óleos essenciais, é um método físico de extração aplicado a frutos do género *Citrus*. Os óleos essenciais são extraídos do pericarpo dos frutos, por prensagem ou picotagem e arrastamento pela água, seguindo-se, em ambos os casos, uma separação por centrifugação (Proença da Cunha *et al*, 2007).

Para a obtenção de outros produtos aromáticos das plantas, a indústria recorre, também, à extração com solventes orgânicos (hexano, cloreto de metileno, etc.). Esta técnica, para além de extrair óleos essenciais, extrai, também, outros produtos de natureza lipofílica como as ceras, resinas e esteróides, entre outros. O solvente é depois separado e obtém-se um produto final, denominado concreto. Este produto é muitas vezes incorporado diretamente nas preparações cosméticas. Adicionalmente, é também possível extrair desse produto apenas a parte aromática, através da utilização de álcool a frio. Após a separação do álcool, obtém-se o denominado absoluto, com aplicações em perfumaria e também em cosmética (Proença da Cunha *et al*, 2007).

A nível laboratorial, a extração dos óleos essenciais faz-se com objetivos distintos dos da indústria e requer a adaptação de determinadas metodologias. A escolha do processo extrativo deve ter em conta diversos fatores, como por exemplo, a volatilidade e o ponto de ebulição dos compostos, o objetivo da análise e a localização do óleo essencial na planta, etc. A hidrodestilação com coação, feita no aparelho de

Clevenger, é a técnica mais utilizada nestes casos e é homologada pelas principais farmacopeias ocidentais (Zuzarte, 2007). A figura 1 ilustra o aparelho de *Clevenger* utilizado na extração dos óleos usados no presente trabalho.

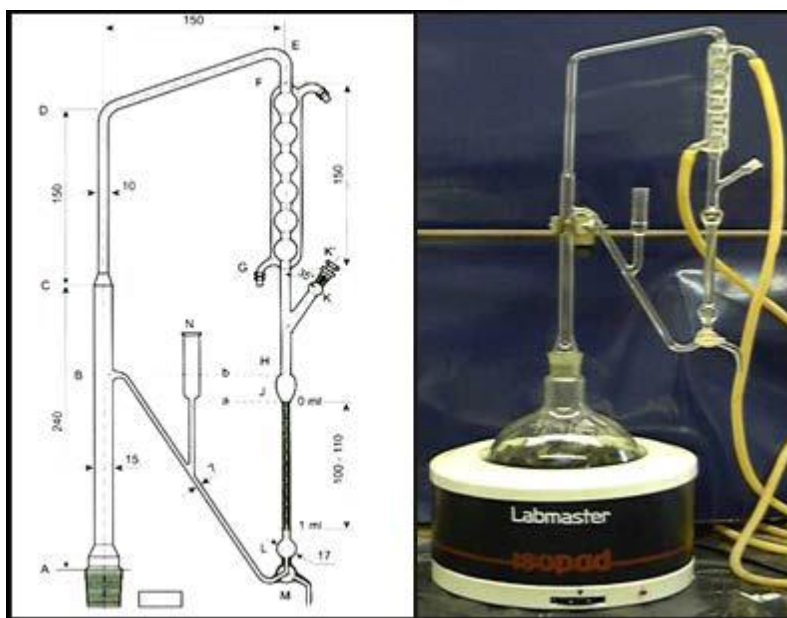


Figura 1. Representação de um aparelho de *Clevenger*.

2.4. Processos analíticos

Os óleos essenciais são, normalmente, misturas complexas de inúmeros compostos, por vezes difíceis de identificar. Isto deve-se à presença de constituintes pertencentes a diferentes classes funcionais, bem como a presença de diferentes tipos de isómeros, com propriedades físicas e químicas muito semelhantes. Como tal, é necessário recorrer a metodologias eficazes e de elevada sensibilidade que permitam a separação e identificação dos diferentes constituintes na mistura. A escolha da metodologia analítica depende essencialmente de dois fatores: a finalidade técnico-científica da análise e o conhecimento previamente disponível sobre a composição dos respetivos óleos essenciais (Lahlou, 2004; Zuzarte, 2007).

Todas as técnicas analíticas envolvem essencialmente duas etapas sequenciais: o fracionamento das amostras e/ou a individualização de constituintes, seguido da aplicação de processos analíticos, químicos ou espectroscópicos, sobre as frações ou sobre os constituintes isolados, levando à sua identificação. A cromatografia de

gás-líquido associada à espectrometria de massa (CGL/MS) é uma das técnicas mais utilizadas para a análise de óleos essenciais (Proença da Cunha, 2009).

2.5. Atividade biológica e importância económica

Os óleos essenciais têm sido utilizados principalmente pelo seu aroma e sabor, mas atualmente têm também um vasto campo de aplicação na indústria farmacêutica e em dermocosmética (Bakkali *et al*, 2008). Muitos investigadores têm dado especial atenção a estes metabolitos e às suas propriedades farmacológicas, nomeadamente o seu modo de ação em áreas diversificadas da saúde humana, como a prevenção e tratamento de cancro, doenças cardiovasculares e diabetes ou como antibacteriano, antiviral ou antioxidante (Edris, 2007).

O mercado das plantas aromáticas e dos óleos essenciais encontra-se fortemente enraizado na Europa e em crescimento nos restantes continentes. Recentes estatísticas da Organização Mundial de Saúde mostram um aumento anual de 10% no mercado internacional destas plantas, movimentando cerca de 45 biliões de euros anualmente (Figueiredo *et al*, 2007).

3. O Género *Thymus*

Este trabalho teve por base o género *Thymus* L. (tomilhos), por incluir plantas aromáticas muito bem representadas em Portugal e pela sua importância na medicina popular, em culinária e ainda, industrialmente para a extração de óleos essenciais (Salgueiro, 1994). Considerando que vários estudos já evidenciaram o potencial medicinal de diversas espécies do género *Thymus* L., considerou-se relevante ampliar essa investigação a outras espécies menos conhecidas.

Os tomilhos são plantas heliófilas que suportam bem as condições extremas de frio e aridez, características das terras altas e da região mediterrânica. Para isso, desenvolveram mecanismos de defesa que se manifestam morfológica e fisiologicamente. Deste modo, muitas destas plantas têm folhas estreitas, quase aciculares, de margem revoluta, minimizando, assim, a superfície foliar exposta à evapotranspiração. Têm, frequentemente, todos os seus órgãos cobertos de pêlos, o que

também contribui para diminuir a transpiração. A exsudação de óleos essenciais é também um meio de defesa à exsicação. Quando submetidos a altas temperaturas ambientais, os tricomas glandulares rompem-se e libertam os óleos essenciais, que ao evaporarem-se saturam de essências o ar em torno da planta, o que impede a evapotranspiração excessiva. A polinização destas plantas é feita por insetos, tratando-se, portanto, de flores entomógamas, sendo os animais atraídos pelo odor e cor das flores (Pereira Coutinho, 1939; Franco, 1984; Salgueiro, 1994; Morales *et al*, 2010).

Sob a denominação vulgar de tomilho, incluem-se as plantas pertencentes ao género *Thymus* L. e ainda a espécie *Thymbra capitata* (L.) Cav., que alguns autores incluíram em *Thymus*, pela sua grande semelhança com plantas deste género (Salgueiro, 1994). Pertencem à família das Lamiaceae, vulgarmente conhecidas por Labiadas, que é uma das famílias da antiga classe das Magnoliopsida, vulgarmente designadas por Dicotiledóneas. Atualmente, de acordo com o mais recente sistema de classificação APG III (2009), é uma família incluída no grupo das Asterídeas. Estas plantas são muito conhecidas e utilizadas fundamentalmente devido aos seus óleos essenciais que possuem diversas atividades biológicas (Naghibi *et al*, 2005).

Atendendo ao número de espécies, *Thymus* é considerado um dos oito géneros mais importantes da família das Labiadas. São conhecidas cerca de 214 espécies e 36 subespécies, num total de 250 *taxa* (Morales, 1997). É um género amplamente distribuído em Portugal e com elevado número de espécies endémicas, tanto ibéricas como lusitânicas (Franco, 1984).

De acordo com Morales (1997) consideram-se sete secções no género *Thymus*, ocorrendo em Portugal apenas cinco: sect. *Mastichina* (Mill.) Benth., sect. *Micantes* Velen., sect. *Pseudothymbra* Benth., sect. *Thymus* subsect. *Thymus*, sect. *Thymus* subsect. *Thymastra* R. Morales, sect. *Serpyllum* (Mill.) Benth. c, sect. *Serpyllum* subsect. *Pseudomarginati* (H. Braun & Borbás) Jalas.

Das onze espécies que ocorrem em Portugal algumas apresentam polimorfismo morfológico, sendo possível considerar nessas espécies *taxa* intra-específicos com áreas fitogeográficas diferentes. Deste modo, consideram-se no total catorze *taxa* portuguesas, como indicado na tabela I.

Tabela I. Espécies e subespécies de *Thymus* L., em Portugal.

<i>T. albicans</i> Hoffmanns. & Link.	
<i>T. caespititius</i> Brot.	
<i>T. camphoratus</i> Hoffmanns. & Link.	
<i>T. carnosus</i> Boiss.	
<i>T. capitellatus</i> Hoffmanns. & Link.	
<i>T. lotocephalus</i> G. López & R. Morales	
<i>T. mastichina</i> L.	subsp. <i>mastichina</i>
	subsp. <i>donyanae</i> R. Morales
<i>T. praecox</i> Opiz.	subsp. <i>ligusticus</i> (Briq.) Paiva e Salgueiro
<i>T. pulegioides</i> L.	
<i>T. villosus</i> L.	subsp. <i>villosus</i>
	subsp. <i>lusitanicus</i> (Boiss.) Coutinho
<i>T. zygis</i> Loefl. ex L.	subsp. <i>zygis</i>
	subsp. <i>syvestris</i> (Hoffmanns. & Link.)
	Brot. ex Coutinho

Este trabalho centra-se essencialmente nas espécies *Thymus camphoratus* e *Thymus carnosus*.

3.1. *Thymus camphoratus* Hoffmanns. & Link.

Thymus camphoratus (Fig. 2), conhecido vulgarmente por tomilho-do-mar (Figueiredo *et al*, 2008a), é um subarbusto de 15-30cm. Caules erectos, ± pubescentes. Folhas pecioladas, 6-8 x 2-4,5mm, ovado-triangulares, agudas a subobtusas, pubescentes a glabrescentes na página superior, tomentoso-esbranquiçadas na inferior, revolutas na margem, não ciliadas. Inflorescências com 8-18 (19) mm de diâmetro, capituliformes, solitárias e terminais. Brácteas 7-9 x 5-8 mm, largamente ovadas, ligeiramente rosadas ou avermelhadas, pubescentes, planas, não ciliadas, com as nervuras proeminentes. Cálice 4-6 mm longo; tubo 2-2,5 mm longo, pubescente; dentes superiores e inferiores ciliados, os superiores iguais. Corola 5-8 mm longa, bilabiada, rosada a purpurescente; lóbulos do lábio inferior grandes, subiguais. Fruto um tetraquénio divisível em 4 mericarpos (Fig. 3) (Morales *et al*, 2010).



Figura 2. *Thymus camphoratus* Hoffmanns. & Link. (adaptada de flora-on.pt)

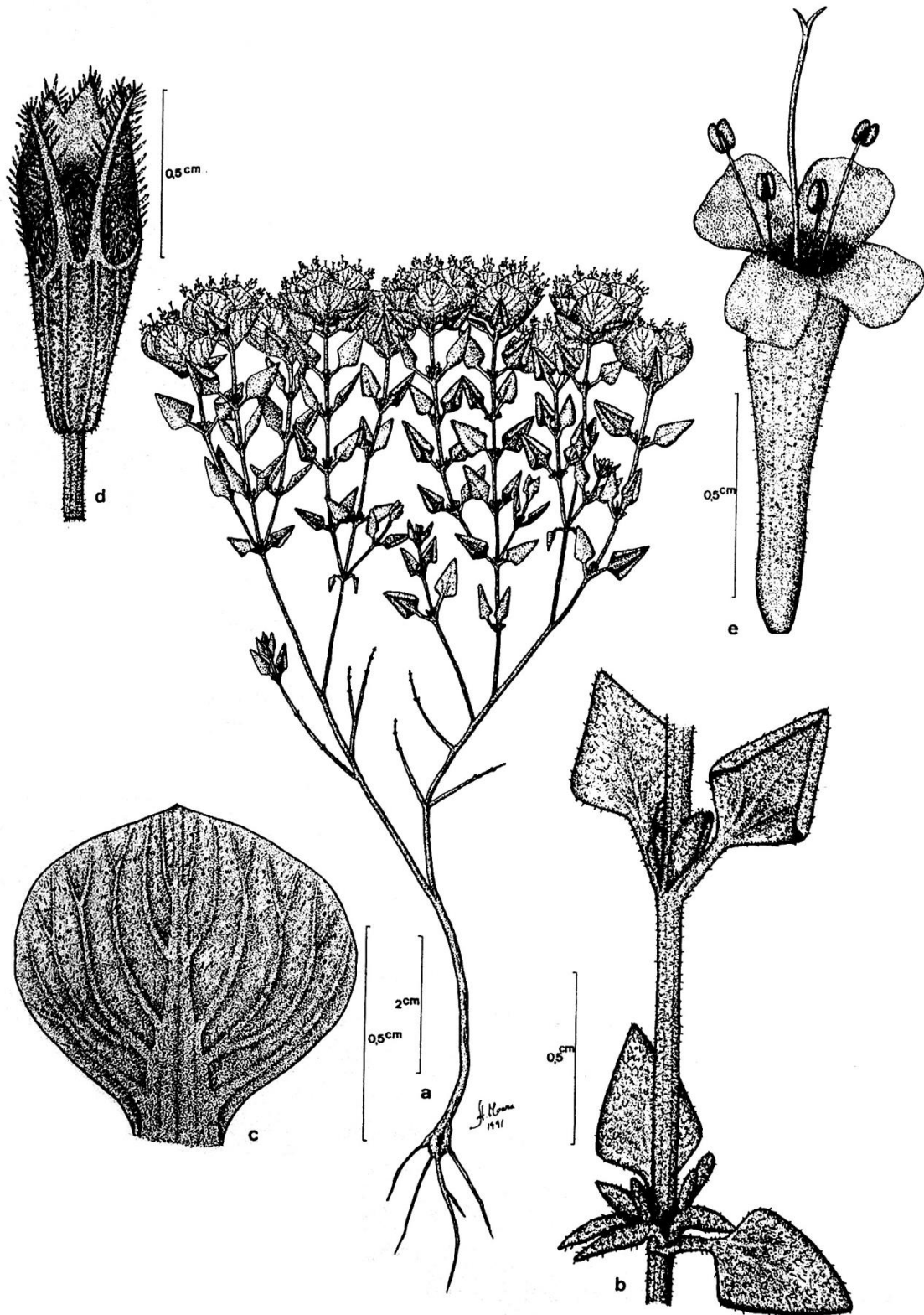


Figura 3. *Thymus camphoratus* Hoffmanns. & Link.: a) hábito; b) ramo; c) bráctea; d) cálice; e) corola. (adaptado de Salgueiro, 1994)

Vive preferencialmente em solos arenosos, calcareníticos e calcários, normalmente sempre perto do mar, nos urzais, matos ou pinhais. Floresce habitualmente de finais de Março a Junho (Franco, 1984; Morales *et al*, 2010).

T. camphoratus é um endemismo lusitânico da zona litoral e sublitoral do sul e sudoeste de Portugal (Fig. 4) e é uma planta incluída na lista de plantas a proteger em Portugal pela Convenção de Berna (Salgueiro, 1994; Morales *et al*, 2010).

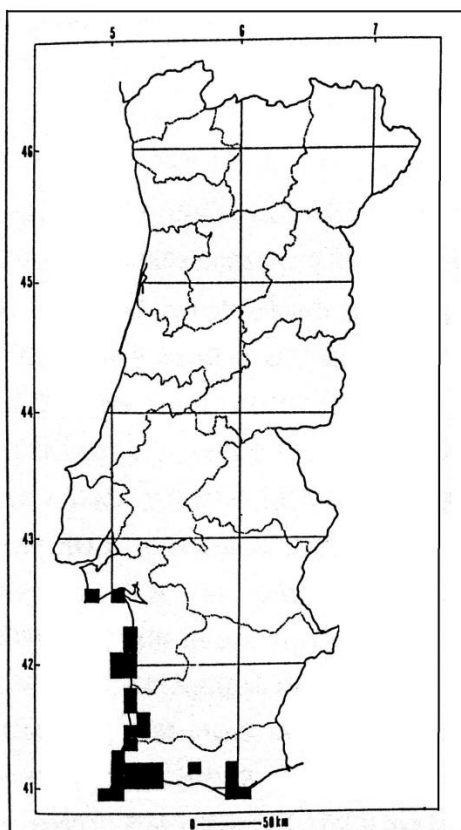


Figura 4. Distribuição em Portugal de *Thymus camphoratus* Hoffmanns. & Link.
(adaptado de Salgueiro, 1994).

No que diz respeito à composição química dos óleos essenciais, esta espécie caracteriza-se por apresentar uma acentuada variabilidade química tendo sido já identificados os seguintes quimiotipos: T-cadinol/linalol; linalol/acetato de linalilo; linalol/acetato de geranilo; borneol/canfeno/cânfora; 1,8-cineol/borneol; 1,8-cineol (Salgueiro *et al*, 1997).

3.2. *Thymus carnosus* Boiss.

Thymus carnosus (Fig. 5), conhecido vulgarmente por tomilho-das-praias (Figueiredo *et al*, 2008a), é um subarbusto de 15-40cm. Caules eretos a ascendentes. Folhas fasciculadas, pecioladas, 4-7 x 1-2 mm, linear-elípticas, subcilíndricas, com margem revoluta, crassas glabras na página superior e pubescentes na inferior; esparsa e curtamente ciliadas na base. Inflorescências geralmente solitárias e terminais, capituliformes, 9-12 (15) mm de diâmetro, excepcionalmente espiciformes até 30 mm de comprimento e com os verticilastos aproximados. Brácteas 5-6 x 3-4 mm, mais largas que as folhas, ovadas, com margem revoluta, ciliadas. Cálice 3-4,5 mm longo, campanulado; tubo c. 2 mm longo, pubescente; dentes superiores subiguais, não ciliados, os inferiores ciliados. Corola bilabiada, até 5mm longa, esbranquiçada, com o lábio superior ± emarginado; lóbulos do lábio inferior geralmente subiguais. Fruto um tetraquénio divisível em 4 mericarpos (Fig. 6) (Morales *et al*, 2010).



Figura 5. *Thymus carnosus* Boiss. (adaptada de flora-on.pt)

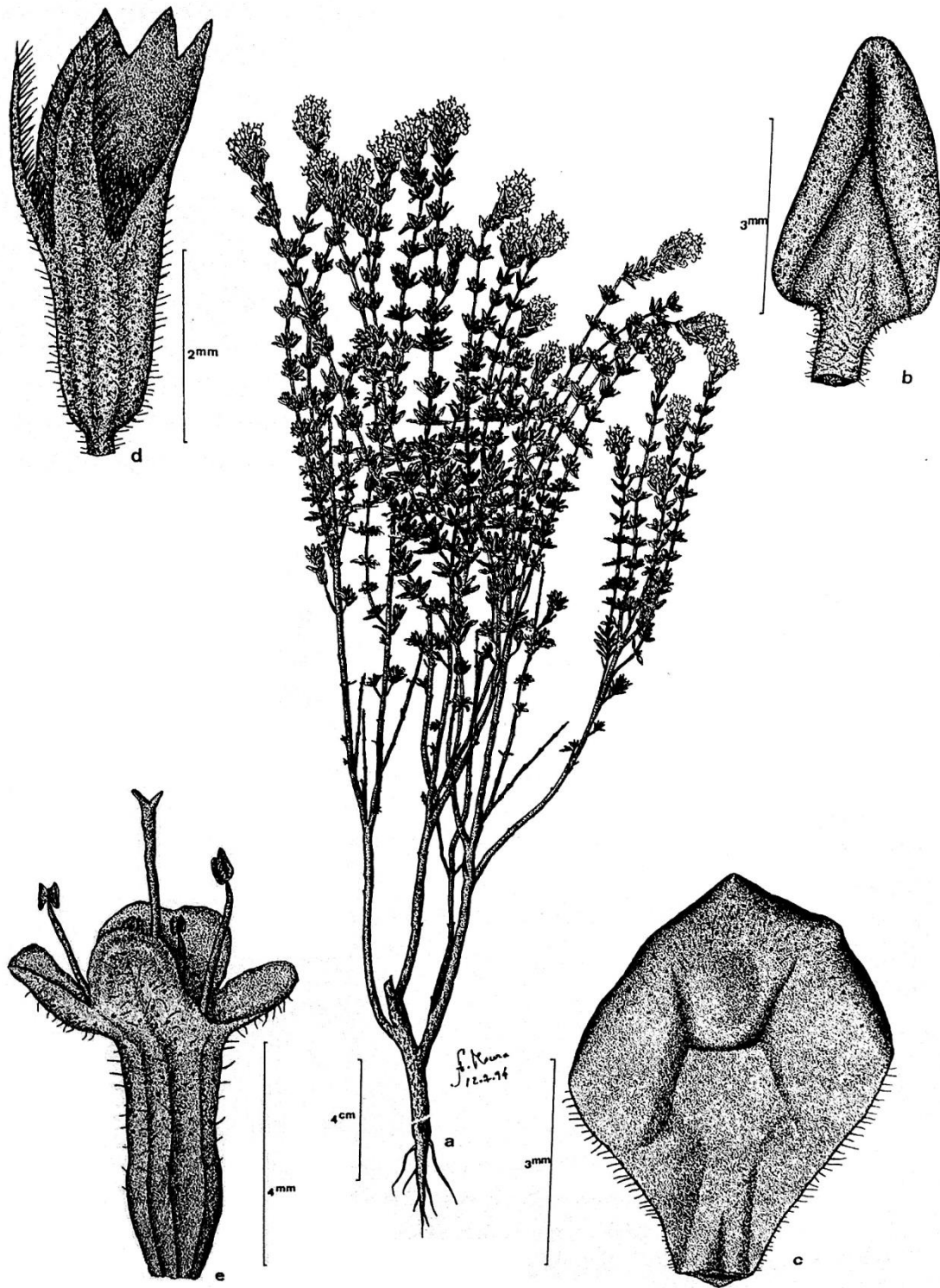


Figura 6. *Thymus carnosus* Boiss.: a) hábito; b) folha; c) bráctea; d) cálice; e) corola. (adaptado de Salgueiro, 1994).

Encontra-se, geralmente, nas dunas litorais e excepcionalmente em arribas arenosas. Floresce normalmente de Maio a Agosto. É um endemismo das zonas costeiras do sudoeste da Península Ibérica e em Portugal encontra-se no litoral estremenho, alentejano e algarvio (Fig. 7) (Franco, 1984; Morales *et al.*, 2010). Esta planta está também incluída na lista de espécies a proteger em Portugal pela Convenção de Berna, pois tem vindo a desaparecer de algumas praias, possivelmente pelo pisoteio e pressão turística (Salgueiro, 1994).

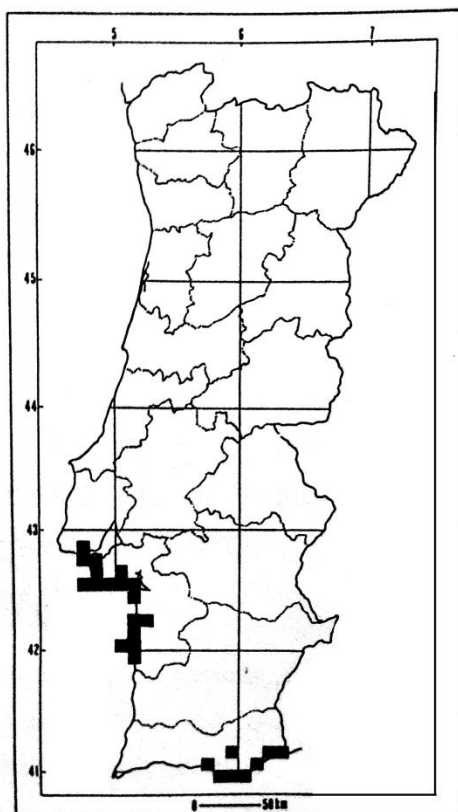


Figura 7. Distribuição em Portugal de *Thymus carnosus* Boiss. (adaptado de Salgueiro, 1994).

Estudos prévios evidenciaram que os óleos essenciais de plantas colhidas em diversas localidades se caracterizam por ter borneol como constituinte principal, com exceção de óleos de plantas colhidas na Estremadura, com teores muito elevados de linalol, por vezes superiores aos do borneol. Este facto pode estar relacionado com fatores ambientais e edáficos (Salgueiro *et al.*, 1995). Até ao momento foi possível caracterizar três tipos de óleos essenciais nesta espécie: borneol/*cis*-hidrato de

sabineno/terpineno-4-ol; borneol/canfeno e linalol/borneol/*trans*-hidrato de sabineno (Salgueiro *et al*, 1995).

4. Objetivos

Apesar de alguns tomilhos, incluindo espécies endêmicas, terem sido anteriormente estudadas evidenciando boas potencialidades antimicrobianas (Figueiredo *et al*, 2008a), muitas espécies continuam por explorar. Neste sentido, o presente trabalho pretende valorizar espécies endêmicas pouco conhecidas validando o potencial bioativo e a segurança (toxicidade) para futura exploração industrial. Para tal, foram selecionadas duas espécies, *T. camphoratus* e *T. carnosus*, para avaliação das propriedades antifúngicas e anti-inflamatórias dos seus óleos essenciais. A atividade antifúngica dos óleos e seus compostos majoritários foi determinada contra estirpes envolvidas em doenças humanas (candidíases, criptococoses, aspergiloses e dermatofitoses) e a atividade anti-inflamatória avaliada num modelo de inflamação *in vitro* (macrófagos estimulados por LPS). Adicionalmente, a citotoxicidade dos óleos foi avaliada, numa linha celular de macrófagos, de forma a identificar concentrações de óleos bioativas e seguras para futuras aplicações farmacêuticas e/ou cosméticas.

II: ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

1. Introdução

As infecções fúngicas têm vindo a aumentar em grande escala nos últimos anos, e sendo normalmente recorrentes e recalcitrantes, contribuem como importante causa de morbidade, especialmente em pacientes de alto risco imunocomprometidos (desnutridos, transplantados ou imunodeprimidos) (Pina-Vaz *et al*, 2004; Pinto *et al*, 2006, Figueiredo *et al*, 2008a).

As plantas aromáticas têm sido utilizadas na medicina tradicional em grande parte devido às suas propriedades antimicrobianas. Os seus óleos essenciais foram por isso reconhecidos, embora empiricamente, durante séculos, e hoje difundiram-se particularmente em ensaios de bioatividade (Faleiro *et al*, 2003; Zuzarte *et al*, 2012). Com efeito, verifica-se a necessidade de aprofundar as investigações sobre a atividade antifúngica, com o objetivo de justificar e validar o uso medicinal destes produtos.

As micoses, doenças infecciosas causadas 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).

1.1. Candidíase

As leveduras de espécies de *Candida* são os principais agentes infecciosos das micoses oportunistas, sendo responsáveis por patologias genericamente designadas por candidíases. A candidíase expressa a variedade de relações que ocorrem entre o hospedeiro e o microbiota autóctone, isto é, do comensalismo à doença sistémica fatal (Crocco *et al*, 2004).

Candida albicans (Fig. 8) é a levedura mais comum nas candidíases cutâneas e da orofaringe, porém outras espécies de *Candida* têm vindo a aumentar em número e em importância nas candidíases vaginal e sistémica (Crocco *et al*, 2004; Palmeira-de-Oliveira *et al*, 2009). Conhecem-se cerca de dezassete espécies de *Candida* causadoras de micoses em seres humanos, sendo as de maior interesse clínico *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. lusitaniae*.

As três primeiras espécies fazem parte da flora dos humanos, provocando infecções apenas em situações de desequilíbrio (Zuzarte, 2007).



Figura 8. Cultura de *Candida albicans*.

O mecanismo patogénico subjacente a estas infecções ainda não está completamente esclarecido, mas tem vindo a ser relacionado muitas vezes com a formação do tubo germinativo. Esta formação é considerada como tendo um papel importante na invasão de tecidos. Por exemplo, blastoconídeos da levedura estão envolvidos na colonização assintomática da vagina, enquanto tubos germinativos e hifas estão presentes nos casos sintomáticos. Os fatores que aumentam ou promovem a formação do tubo germinativo tendem a precipitar os casos sintomáticos, enquanto a inibição da formação desses tubos pode impedir a candidíase em portadores assintomáticos.

A organização estrutural de *Candida* em biofilmes representa outro relevante mecanismo patogénico e parece ser responsável pela resistência aos antifúngicos geralmente utilizados, reduzindo, portanto, a eficácia destes químicos (Sobel *et al*, 1984; Rodrigues *et al*, 1999; Sobel, 2007; Palmeira-de-Oliveira *et al*, 2009).

Neste sentido, estas estruturas despertaram atenção e têm vindo a ser estudadas, devido à sua relevância para o controlo e erradicação de infecções (Palmeira-de-Oliveira *et al*, 2009).

1.2. Criptococose

Cryptococcus neoformans (Fig. 9) causa uma patologia designada por criptococose (Crocco *et al*, 2004; Brizendine *et al*, 2011). Trata-se de uma micose sistêmica que constitui uma importante causa de morte em doentes imunocomprometidos ou transplantados, sendo também a causa mais comum de meningite crônica, pois é um fungo monomórfico com foco primário de infecção no pulmão, podendo também atingir o cérebro e meninges (Lin e Heitman, 2006; Brizendine *et al*, 2011; Desalermos *et al*, 2012). Os excrementos das aves (particularmente de pombos) favorecem o crescimento de *C. neoformans* atuando como reservatório de infecção, crescendo de modo exuberante, embora as aves não sejam infetadas (Crocco *et al*, 2004).



Figura 9. Cultura de *Cryptococcus neoformans*.

1.3. Aspergilose

A aspergilose representa um espectro de doenças que podem ser causadas por diversas espécies de *Aspergillus*. Estas espécies são sapróbios omnipresentes na natureza e a aspergilose ocorre no mundo inteiro (Crocco *et al*, 2004), conhecendo-se três manifestações distintas da patologia: aspergiloma pulmonar, aspergilose invasiva e aspergilose broncopulmonar alérgica (Khan e Ahmad, 2011), maioritariamente causadas por *A. fumigatus* (Fig. 10 a) e menos frequentemente por *A. niger* (Fig. 10- b), *A. flavus* (Fig. 10 – c), *A. clavatus*, *A. terreus* e *A. lentulus* (Crocco *et al*, 2004; Khan e Ahmad, 2011). Tais fungos produzem quantidades abundantes de pequenos conídeos facilmente

aerossolizados. Após a inalação destes conídeos, os indivíduos atópicos desenvolvem frequentemente reações alérgicas graves aos antígenos dos conídeos. Em pacientes imunocomprometidos (particularmente doentes com leucemia, transplantados ou em uso de corticosteróides), os conídeos podem germinar, produzindo hifas que invadem os pulmões e outros tecidos, levando à morte (Crocco *et al*, 2004; Pfaller *et al*, 2010; Kousha *et al*, 2011).

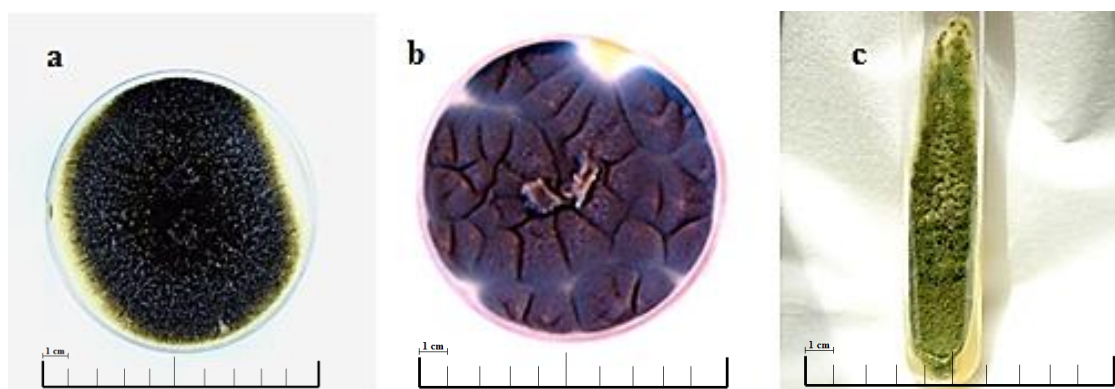


Figura 10. Cultura de: a) *Aspergillus fumigatus*, b) *Aspergillus niger* e c) *Aspergillus flavus*.

1.4. Dermatofitose

As dermatofitoses, provocadas por fungos filamentosos, dermatófitos, são infecções cutâneas que ocorrem à superfície, nas camadas queratinizadas do tegumento e dos seus apêndices, como pele, cabelo e unhas. Estes fungos utilizam a queratina como fonte de carbono, sendo a infecção geralmente restrita às camadas não vivas da superfície corpórea (Hainer, 2003; Dahdah e Sher, 2008; Monod, 2008). Normalmente residem no solo ou na vegetação, e penetram na pele ou no tecido subcutâneo por inoculação traumática com material contaminado. A transmissão também pode ocorrer pelo contato direto com animais e humanos infetados. As lesões tornam-se granulomatosas e expandem-se lentamente a partir da área de implantação (Peres *et al*, 2010; Zuzarte *et al*, 2011). Em geral, estas micoses limitam-se aos tecidos subcutâneos, todavia, e em raros casos, tornam-se sistêmicas e causam doença potencialmente fatal (Crocco *et al*, 2004). Estas infecções têm aumentado consideravelmente entre populações pediátricas e geriátricas (Mukherjee *et al*, 2003; Khan e Ahmad, 2011). Conhecem-se

três gêneros de dermatófitos: *Trichophyton*, *Microsporium* e *Epidermophyton* (Fig. 11) (Zuzarte *et al*, 2011).

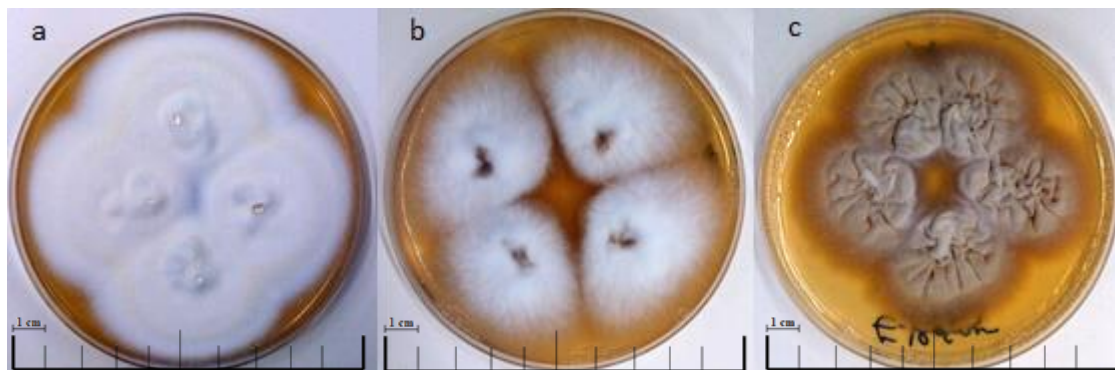


Figura 11. Cultura de: a) *Trichophyton* spp., b) *Microsporium* spp. e c) *Epidermophyton* sp.

1.5. Antifúngicos sintéticos

Os fungos são microrganismos eucarióticos, que possuem uma espessa parede constituída por quitina e polissacarídeos e têm também uma membrana celular cujo principal constituinte é ergosterol (Sidrim e Moreira, 1999). A maioria dos antifúngicos atua ao nível do ergosterol, ligando-se a este. Esta ligação abre poros e canais da membrana que aumentam a sua permeabilidade, levando à perda de eletrólitos do meio intracelular e consequente morte celular (White *et al*, 1998; Bergold e Georgiadis, 2004).

Os antifúngicos estão divididos em grupos, de acordo com o seu mecanismo e espectros de ação. Os poliénicos, incluem a nistatina e anfotericina B, que atuam ligando-se ao ergosterol e são principalmente ativos contra leveduras e algumas espécies de *Aspergillus*. Os derivados azólicos, como por exemplo cetoconazol, fluconazol e itraconazol, atuam inibindo a biossíntese de lípidos da membrana celular (particularmente ergosterol) e são principalmente utilizados em micoses sistémicas e dermatofitoses. As alilaminas, como a terbinafina e naftifina, actuam inibindo a biossíntese do ergosterol e são eficazes no tratamento tópico das dermatofitoses e candidíases cutâneas. Com espectros de ação muito restritos existe a flucitosina, que é desaminada pelos fungos em 5-fluorouracil, um potente antimetabólico, que prejudica a

síntese de ADN do próprio fungo, como as leveduras e a griseofulvina, que actua ao nível do fuso mitótico impedindo a multiplicação do organismo, sendo utilizada em dermatofitoses (White *et al*, 1998; Sidrim e Moreira, 1999; Bergold e Georgiadis, 2004).

A anfotericina B e o fluconazol, têm sido os fármacos de primeira escolha terapêutica (Bergold e Georgiadis, 2004), no entanto, para além do aumento da resistência dos fungos, ambos os fármacos apresentam alguns efeitos colaterais, principalmente quando administrados com outras drogas. É essencialmente por estas razões que a indústria farmacêutica tem investido na pesquisa de novos agentes terapêuticos, eficazes, económicos e que apresentem baixa toxicidade para os pacientes (Anaissie *et al*, 1996; Zuzarte, 2007).

1.6. Objetivos

Vários estudos têm mostrado que os óleos essenciais de tomilhos, particularmente *T. vulgaris* L. e *T. zygis* L., apresentam atividade antimicrobiana, sendo os do tipo fenólico normalmente mais ativos (Pinto *et al*, 2006). Neste pressuposto seria interessante verificar se outras espécies do mesmo género, com composições químicas diferentes, também apresentam propriedades antifúngicas.

Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica dos óleos essenciais de *T. camphoratus* Hoffmanns. & Link. (duas amostras, 1 e 2) e *T. carnosus* Boiss. (uma amostra) e dos seus compostos principais, em estirpes de leveduras, dermatófitos e *Aspergillus*. Os três óleos foram também avaliados na capacidade de inibição do tubo germinativo de *C. albicans*.

2. Materiais e Métodos

A atividade antifúngica dos óleos essenciais foi avaliada no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

2.1. Óleos essenciais e compostos puros testados

Para avaliar a atividade antifúngica foram utilizadas duas amostras de óleo essencial de *T. camphoratus* e uma amostra de óleo essencial de *T. carnosus*, extraídos no laboratório de acordo com a Farmacopeia Europeia (Council of Europe, 2010).

Paralelamente foi avaliada a atividade dos seus compostos químicos principais, de acordo com o perfil químico obtido por CGL/EM. Para tal, foram usadas amostras comerciais dos compostos puros: α -pineno, borneol, canfeno, terpineno-4-ol e *cis*-hidrato de sabineno (Fluka) e 1,8-cineol (Merck).

Estudos prévios realizados no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra permitiram avaliar o rendimento e perfil químico obtido por CGL e CGL/EM dos óleos essenciais. A tabela II sistematiza o rendimento em óleo essencial e os principais compostos identificados nas espécies em estudo.

Tabela II. Rendimento, constituintes maioritários e proveniência dos óleos essenciais de *Thymus camphoratus* e *Thymus carnosus*.

Amostras	Rendimento	Composição	Proveniência
<i>T. camphoratus</i> 1	1,4 % (p/v)	borneol: 24% 1,8-cineol: 20% α -pineno: 11% canfeno: 10,5%	Odemira Baixo Alentejo
<i>T. camphoratus</i> 2		1,8-cineol: 12,5% borneol: 10% canfeno: 10% α -pineno: 6%	Lagos Algarve
<i>T. carnosus</i>	1,8 % (p/v)	borneol: 29% <i>cis</i> -hidrato de sabineno: 10% terpineno-4-ol: 10% canfeno: 7,5%	Praia da Manta Rota Algarve

2.2. Estirpes fúngicas testadas

A atividade antifúngica dos óleos essenciais e dos seus compostos majoritários foi avaliada contra diferentes estirpes de leveduras e fungos filamentosos (Tabela III).

Tabela III. Estirpes de leveduras e fungos filamentosos.

	Estirpes	Proveniência
Leveduras	<i>Candida krusei</i> H9 <i>Candida guilliermondii</i> MAT23	Estirpes clínicas isoladas de casos recorrentes de candidíases vulvovaginais.
	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231 <i>Candida tropicalis</i> ATCC 13803 <i>Candida parapsilosis</i> ATCC 90018	American Type Culture Collection.
	<i>Cryptococcus neoformans</i> CECT 1078	Colección Española de Cultivos Tipo.
	<i>Aspergillus</i> <i>A. flavus</i> F44	Estirpe clínica isolada de secreções brônquicas.
Fungos Filamentosos	<i>A. fumigatus</i> ATCC 46645 <i>A. niger</i> ATCC 16404	American Type Culture Collection.
	(Dermatófitos) <i>T. mentagrophytes</i> FF7 <i>M. canis</i> FF1 <i>E. floccosum</i> FF9	Estirpes clínicas isoladas de unhas e pele.
	<i>Trichophyton</i> , <i>Microsporum</i> , <i>Epidermophyton</i> <i>T. rubrum</i> CECT 2794 <i>M. gypseum</i> CECT 2908 <i>T. verrucosum</i> CECT 2992 <i>T. mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i> CECT 2958	Colección Española de Cultivos Tipo.

2.3. Atividade Antifúngica

A concentração mínima inibitória (MIC) e a concentração mínima letal (MLC) dos óleos essenciais e dos seus constituintes majoritários foram determinadas pelo método de macrodiluição, de acordo com os protocolos da *Clinical and Laboratory Standards Institute* M27-A3 (CLSI, 2008), M27-S3 (CLSI, 2008) e M38-A2 (CLSI, 2008), para leveduras e fungos filamentosos, respetivamente.

Em cada ensaio foram preparadas diferentes diluições, em duplicado, de cada amostra de óleo essencial em dimetil sulfóxido (DMSO), que foram adicionadas a cada tubo de ensaio, obtendo-se uma concentração variável entre 0,04 a 20 $\mu\text{L mL}^{-1}$. A concentração final de DMSO nunca excedeu os 2% (v/v).

Culturas recentes de cada estirpe foram usadas na preparação de suspensões celulares ajustadas a $(1-2)\times 10^3$ células mL^{-1} para leveduras e $(1-2)\times 10^4$ células mL^{-1} para fungos filamentosos, sendo a concentração final de células confirmada por contagem em Sabouraud Dextrose Agar. Os tubos de ensaio foram inoculados aerobiamente a 35°C durante 48h/72h (*Candida* spp. e *Aspergillus* spp./ *C. neoformans*) e a 30°C durante 7 dias (dermatófitos), sendo depois determinado o valor de MIC. Este é definido como a menor concentração de óleo essencial que inibe o crescimento do fungo. Para avaliar o MLC, alíquotas de 20 μL foram tiradas dos tubos que não apresentaram crescimento visível, após leitura do MIC, e foram cultivadas em caixas de Petri com Sabouraud Dextrose Agar. Estas foram incubadas a 37°C durante 48h/72h (*Candida* spp. e *Aspergillus* spp./ *C. neoformans*) e a 30°C durante 7 dias (dermatófitos). O valor de MLC é definido como a menor concentração de óleo essencial que mata o fungo.

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

Todos os ensaios foram realizados em meio RPMI 1640 (sem bicabornato, com L-glutamina e indicador de pH) e para cada estirpe foram testadas as condições de crescimento bem como a esterilidade do meio, em dois tubos de controlo. A inocuidade e esterilidade do DMSO foram também avaliadas na sua concentração mais elevada. Todos os resultados foram obtidos a partir de três ensaios independentes realizados em duplicado, repetidos aquando da divergência de resultados.

2.4. Inibição do tubo germinativo

Suspensões celulares de *C. albicans* ATCC 10231, após crescimento *overnight* em SDA, foram preparadas em meio NYP [*N-acetilglucosamine* (Sigma; 10^{-3} mol.L⁻¹), *Yeast Nitrogen Base* (Difco; 3.35 g.L⁻¹), *Proline* (Fluka; 10^{-3} mol.L⁻¹), NaCl (4.5 g.L⁻¹)

e pH 6.7 ± 0.1] (Marichal *et al*, 1986) e ajustadas para obter uma densidade de $1.0 \pm 0.2 \times 10^6$ CFU.mL⁻¹. Os óleos essenciais foram diluídos em DMSO e adicionados num volume de 10 µL para 990 µL da suspensão celular (concentração final de DMSO de 1% v/v), obtendo uma série de concentrações sub-inibitórias (até 1/64 do MIC). As amostras foram incubadas por 3h a 37°C, sem agitação, e posteriormente 100 células de cada amostra foram contadas numa Câmara de Neubauer e a percentagem de tubos germinativos foi determinada. Tubos germinativos foram considerados positivos quando o seu comprimento era tão longo quanto o diâmetro da célula, sendo excluídas protuberâncias que mostravam uma constrição no ponto de ligação à célula-mãe. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão de três ensaios realizados em separado.

3. Resultados

3.1. Atividade antifúngica

Os resultados obtidos para a atividade antifúngica dos óleos essenciais de *T. camphoratus* e *T. carnosus* e dos seus constituintes principais estão representados nas tabelas IV e V, respetivamente.

Os óleos essenciais das duas amostras de *T. camphoratus* (1- Odemira, 2-Lagos), mostraram atividades antifúngicas semelhantes com valores de MIC a variarem desde 0,64-1,25 µL mL⁻¹ para dermatófitos, 1,25-5 µL mL⁻¹ para *Aspergillus* spp., 1,25-5 µL mL⁻¹ para *Candida* spp. e 0,16 µL mL⁻¹ para *C. neoformans*. A amostra oriunda de Odemira (amostra 1) mostrou ser ligeiramente mais ativa que a de Lagos (amostra 2) particularmente para *C. parapsilosis*, *T. mentagrophytes* var. *interdigilate*, *A. niger* e *A. fumigatus*.

No que respeita aos compostos isolados, α -pineno mostrou ser o composto mais activo com valores de MIC a variar desde 0,08-1,25 µL mL⁻¹. Os restantes compostos maioritários de *T. camphoratus* foram menos efetivos do que o óleo essencial.

Relativamente ao óleo de *T. carnosus* observaram-se resultados semelhantes, embora menos ativos que os óleos de *T. camphoratus*, para os dermatófitos. Assim, para os dermatófitos, os valores de MIC variaram desde 0,64-2,5 µL mL⁻¹; para as espécies

II: ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

de *Aspergillus* variaram desde 2,5-5 $\mu\text{L mL}^{-1}$; em *Candida* spp. 1,25-2,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ e *C. neoformans* 0,16 $\mu\text{L mL}^{-1}$.

No que respeita aos compostos isolados apenas o terpineno-4-ol apresentou melhor actividade para *Aspergillus* spp. do que o óleo essencial.

Tabela IV. Atividade antifúngica (MIC e MLC) do óleo essencial de *Thymus camphoratus* (Odemira e Lagos) e dos seus compostos maioritários (borneol, canfeno, α -pineno, 1,8-cineol) contra estirpes de leveduras, dermatófitos e *Aspergillus*.

Estirpes	<i>Thymus camphoratus</i> (Odemira)		<i>Thymus camphoratus</i> (Lagos)		borneol		canfeno		α -pineno		1,8-cineol		Fluconazole		Anfotericina B	
	MIC ^a	MLC ^a	MIC ^a	MLC ^a	MIC ^a	MLC ^a	MIC ^a	MLC ^a	MIC ^a	MLC ^a	MIC ^a	MLC ^a	MIC ^b	MLC ^b	MIC ^b	MLC ^b
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	1,25	1,25	1,25-2,5	1,25-2,5	2,5	>20	>20	>20	0,64-1,25	0,64-1,25	10	10	1	>128	N.T	N.T
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 13803	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	>20	>20	>20	1,25	1,25-2,5	20	20	4	>128	N.T	N.T
<i>Candida krusei</i> H9	2,5	2,5	2,5	2,5	5	>20	\geq 10	\geq 20	0,16-0,32	0,32	10	10	64	64-128	N.T	N.T
<i>Candida guilliermondii</i> MAT23	1,25	1,25	1,25	2,5	2,5	2,5	\geq 10	\geq 10	0,64	0,64	10	10	8	8	N.T	N.T
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 90018	2,5	2,5-5	5	5	5	>20	\geq 20	\geq 20	0,32	0,32	10	10	<1	<1	N.T	N.T
<i>Cryptococcus neoformans</i> CECT 1078	0,16	0,32	0,16	0,32	1,25	1,25	5	5	0,08	0,32	5-10	10	16	128	N.T	N.T
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> FF7	0,64	0,64	0,64	0,64	2,5	5	5	5-10	0,32	0,32-0,64	5	5	16-32	32-64	N.T	N.T
<i>Microsporum canis</i> FF1	0,64	0,64	0,64	0,64	2,5	2,5	5	5	0,16	0,16-0,32	5	5	128	128	N.T	N.T
<i>Trichophyton rubrum</i> CECT 2794	0,64	0,64	0,64	0,64	2,5	2,5	2,5-5	5	0,08	0,08	2,5-5	5	16	64	N.T	N.T
<i>Microsporum gypseum</i> CECT 2908	0,64	0,64-1,25	0,64	0,64-1,25	2,5	2,5	10	10	0,16	0,16	5-10	5	128	>128	N.T	N.T
<i>Epidermophyton floccosum</i> FF9	0,64	0,64	0,64	0,64	2,5	2,5	5	5	0,16	0,16	5	5	16	16	N.T	N.T
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> var. <i>interdigilate</i> CECT 2958	0,64	1,25	1,25	1,25	2,5	5	10-20	10-20	0,32	0,32	10	10	128	\geq 128	N.T	N.T
<i>Trichophyton verrucosum</i> CECT 2992	1,25	1,25	1,25	1,25	2,5	2,5	20	20	1,25	1,25	10	10-20	>128	>128	N.T	N.T
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	1,25	>10	2,5	>10	5	>20	>20	>20	2,5	5	10	>20	N.T	N.T	1-2	4
<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 46645	1,25	10	2,5	>10	2,5	>20	>20	>20	1,25	1,25-2,5	10	10-20	N.T	N.T	2	4
<i>Aspergillus flavus</i> F44	5	\geq 10	5	>10	5	>20	>20	>20	1,25	1,25	20	20	N.T	N.T	2	8

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

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

N.T – Não testado.

Resultados obtidos a partir de três ensaios independentes realizados em duplicado.

Tabela V. Atividade antifúngica (MIC e MLC) do óleo essencial de *Thymus carnosus* e dos seus compostos maioritários (borneol, *cis*-hidrato de sabineno, terpineno-4-ol, canfeno) contra estirpes de leveduras, dermatófitos e *Aspergillus*.

Estirpes	<i>Thymus carnosus</i>		borneol		<i>cis</i> -hidrato de sabineno		terpineno-4-ol		canfeno		Fluconazole		Anfotericina B	
	MIC ^a	MLC ^a	MIC ^a	MLC ^a	MIC ^a	MLC ^a	MIC ^a	MLC ^a	MIC ^a	MLC ^a	MIC ^b	MLC ^b	MIC ^b	MLC ^b
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	1,25	1,25	2,5	>20	5	5	1,25	2,5	>20	>20	1	>128	N.T	N.T
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 13803	2,5	2,5	2,5	>20	5-10	5-10	2,5	2,5	>20	>20	4	>128	N.T	N.T
<i>Candida krusei</i> H9	2,5	2,5	5	>20	10	10	2,5	2,5	≥10	≥20	64	64-128	N.T	N.T
<i>Candida guilliermondii</i> MAT23	1,25	2,5	2,5	2,5	5	5	1,25-2,5	2,5	≥10	≥10	8	8	N.T	N.T
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 90018	2,5	5	5	>20	5	10	1,25-2,5	2,5	≥20	≥20	<1	<1	N.T	N.T
<i>Cryptococcus neoformans</i> CECT 1078	0,16	0,32	1,25	1,25	5	5	1,25	1,25-2,5	5	5	16	128	N.T	N.T
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> FF7	1,25	1,25	2,5	5	20	20	2,5	2,5	5	5-10	16-32	32-64	N.T	N.T
<i>Microsporum canis</i> FF1	1,25	1,25	2,5	2,5	5-10	5-10	1,25	1,25	5	5	128	128	N.T	N.T
<i>Trichophyton rubrum</i> CECT 2794	0,64	1,25	2,5	2,5	5-10	5-10	1,25	1,25	2,5-5	5	16	64	N.T	N.T
<i>Microsporum gypseum</i> CECT 2908	2,5	2,5	2,5	2,5	10	10	2,5	2,5	10	10	128	>128	N.T	N.T
<i>Epidermophyton floccosum</i> FF9	1,25	1,25	2,5	2,5	5	5	1,25	1,25	5	5	16	16	N.T	N.T
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> var. <i>interdigilate</i> CECT 2958	1,25	2,5	2,5	5	20	20	1,25-2,5	2,5	10-20	10-20	128	≥128	N.T	N.T
<i>Trichophyton verrucosum</i> CECT 2992	2,5	2,5	2,5	2,5	5	5	1,25-2,5	2,5	20	20	>128	>128	N.T	N.T
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	2,5	>20	5	>20	20	>20	0,64-1,25	2,5-5	>20	>20	N.T	N.T	1-2	4
<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 46645	2,5	10	2,5	>20	10	>20	0,64-1,25	2,5	>20	>20	N.T	N.T	2	4
<i>Aspergillus flavus</i> F44	5	>10	5	>20	20	>20	1,25-2,5	2,5	>20	>20	N.T	N.T	2	8

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

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

N.T – Não testado.

Resultados obtidos a partir de três ensaios independentes realizados em duplicado.

3.2. Inibição do tubo germinativo

Os resultados obtidos na quantificação de tubos germinativos de *C. albicans* ATCC 10231 com os óleos essenciais de *T. camphoratus* e *T. carnosus* estão representados na tabela VI.

Os três óleos essenciais inibiram por completo a formação do tubo germinativo a concentrações de $0,64 \mu\text{L mL}^{-1}$ ($1/2$ do valor MIC).

Tabela VI. Percentagem de filamentação de *Candida albicans* ATCC 10231 com as concentrações sub-inibitórias dos óleos essenciais de *T. camphoratus* e *T. carnosus*.

	<i>T. camphoratus</i> (Odemira)	<i>T. camphoratus</i> (Lagos)	<i>T. carnosus</i>
Controlo^a		83,4 ± 0,7	
MIC/64 (0,02)^b	74,8 ± 1,6	76,0 ± 8,2	81,3 ± 2,8
MIC/32 (0,04)	62,7 ± 1,9	67,7 ± 4,3	72,7 ± 3,9
MIC/16 (0,08)	57,7 ± 6,1	51,3 ± 5,0	61,8 ± 7,1
MIC/8 (0,16)	34,7 ± 1,2	35,8 ± 7,9	42,7 ± 4,1
MIC/4 (0,32)	13,8 ± 7,7	9,5 ± 3,1	12,0 ± 5,0
MIC/2 (0,64)	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

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

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

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

4. Discussão

Os ensaios de avaliação da atividade antifúngica mostraram que os óleos essenciais de ambas as espécies apresentaram maior atividade contra *C. neoformans*. Os óleos de *T. camphoratus* também mostraram ser ativos contra os dermatófitos.

Os valores de MIC e MLC variaram entre as várias estirpes testadas, mas na maioria dos casos os valores de MIC foram iguais aos de MLC, indicando actividade fungicida dos óleos essenciais. Este efeito fungicida não foi observado nas estirpes de *Aspergillus*.

Ambas as amostras de *T. camphoratus*, apesar de apresentarem alguma variabilidade quantitativa nos seus principais compostos, mostraram atividade antifúngica idêntica, sendo apenas ligeiramente mais efetiva a amostra de Odemira para algumas estirpes, destacando-se em ambas uma maior atividade contra *C. neoformans* e dermatófitos. Dos seus compostos maioritários, todos apresentaram uma baixa atividade, com exceção do α -pineno, que na maioria dos casos apresentou melhor atividade que os óleos, o que mostra que este composto poderá ter um contributo relevante na atividade destes óleos, como ficou evidente na amostra que tem maior teor deste composto (*T. camphoratus* 1).

O óleo essencial de *T. carnosus* mostrou ter uma maior atividade do que os seus compostos maioritários puros, com exceção do terpineno-4-ol que mostrou ter uma atividade idêntica à do óleo, sendo superior no caso dos *Aspergillus* e inferior no caso de *C. neoformans*. Estes resultados evidenciam que a atividade do óleo se pode dever fundamentalmente à contribuição do terpineno-4-ol.

Vários estudos têm mostrado que os óleos de *Thymus* possuem atividade antifúngica, sendo os mais ativos os do tipo fenol (timol e carvacrol), nomeadamente *T. vulgaris*, *T. zygis* subsp. *zygis*, *T. zygis* subsp. *sylvestris*, *T. pulegioides*, *T. herba-barona*, *T. x viciosoi* (Pina-Vaz *et al*, 2004; Pinto *et al*, 2006; Figueiredo *et al*, 2008a; Gonçalves *et al*, 2010; Vale-Silva *et al*, 2010; Zuzarte *et al*, 2011; Zuzarte *et al*, 2013), assim como o óleo de *Thymbra capitata* (Salgueiro *et al*, 2004). Para estes óleos, os valores de MIC e MLC (usando o método da macrodiluição) demonstraram ser mais baixos (melhor atividade) em comparação com os resultados das espécies estudadas neste trabalho. Outros óleos, não fenólicos, como *T. mastichina* subsp. *mastichina* e *T. capitellatus*, mostraram também menor actividade. Estes resultados devem-se fundamentalmente à sua composição rica em borneol e 1,8-cineol (Pina-Vaz *et al*, 2004; Salgueiro *et al*, 2006; Figueiredo *et al*, 2008a).

Outros estudos realizados em várias espécies do género *Thymus*, usando diferentes métodos de avaliação da atividade antifúngica, como a microdiluição e difusão em agar, mostraram igualmente uma boa atividade (Faleiro *et al*, 2003; Dandlen *et al*, 2011) especialmente quando os óleos continham timol e carvacrol (Viollon e Chaumont, 1994; Karaman *et al*, 2001; Palmeira-de-Oliveira *et al*, 2009; Al-Fatimi *et al*, 2010; Khan e Ahmad, 2011).

A atividade antifúngica de *T. camphoratus*, contendo elevados teores em 1,8-cineol, e de *T. carnosus*, com elevados teores em borneol, foi também testada, usando o método de difusão em agar contra estirpes de *C. albicans* mostrando diminuta atividade (Faleiro *et al*, 2003; Dandlen *et al*, 2011).

Tendo em conta os estudos realizados nas diversas espécies de tomilhos, os resultados de atividade antifúngica obtidos enquadram-se na classificação proposta em função da composição química: fenóis> aldeídos> cetonas> álcoois> ésteres> hidrocarbonetos (Kalemba e Kunicka, 2003; Figueiredo *et al*, 2008a).

Óleos de outros géneros que com os mesmos compostos maioritários que as espécies do presente estudo (borneol, α -pineno, 1,8-cineol, terpineno-4-ol), embora em concentrações variáveis, apresentaram atividade semelhante contra algumas das mesmas estirpes testadas (Adam *et al*, 1998; Hammer *et al*, 2003; Mondello *et al*, 2003; Kordali *et al*, 2005; Mondello *et al*, 2006; Cleff *et al*, 2010; Cavalcanti *et al*, 2011).

O efeito dos óleos essenciais foi também avaliado na inibição da formação do tubo germinativo, que é um fator importante de virulência. Todos os óleos mostraram uma percentagem de inibição muito idêntica, para as respetivas concentrações sub-inibitórias de MIC testadas, observando-se uma inibição total do tubo germinativo na concentração de $0,64\mu\text{L mL}^{-1}$ (MIC/2). Estes resultados foram semelhantes aos obtidos por Pina-Vaz *et al* (2004), em óleo de *T. mastichina*, que se caracteriza por ter teores elevados de 1,8-cineol.

Os resultados obtidos nas concentrações de $0,08-0,32\mu\text{L mL}^{-1}$ foram semelhantes ao óleo de *Thymbra capitata* (Salgueiro *et al*, 2004) e *T. vulgaris*, mas notoriamente diferentes ao óleo de *T. zygis* (Pina-Vaz *et al*, 2004). Este último apresentou uma percentagem de inibição consideravelmente menor para as mesmas concentrações (Pina-Vaz *et al*, 2004). Comparativamente ao estudo de Vale-Silva *et al* (2010) com o óleo de *T. x viciosoi*, os óleos contemplados neste trabalho apresentaram uma percentagem superior de inibição na concentração de $0,16\mu\text{L mL}^{-1}$. Assim, os óleos de *T. camphoratus* e *T. carnosus* apresentam globalmente melhores resultados que alguns tomilhos constituídos maioritariamente por timol, no que respeita à inibição do tubo germinativo.

Apesar dos óleos não terem apresentado uma atividade antifúngica muito pronunciada, a sua interferência ao nível da formação do tubo germinativo de *C. albicans* apresentou bons resultados. 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 facto dos óleos essenciais inibirem a sua formação, torna-os bons agentes terapêuticos.

III: ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

1. Introdução

A incidência de doenças relacionadas com a inflamação tem vindo a aumentar nas últimas décadas (Zuzarte *et al*, 2013) sendo a inflamação crónica associada a patologias severas como cancro, artrite reumatóide, diabetes, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, considerada uma das maiores causas de mortalidade em todo o mundo (Schmidt e Duncan, 2003; Porta *et al*, 2009; Whitney *et al*, 2009; Hunter e Doddi, 2010; Francisco *et al*, 2011).

A inflamação é uma resposta do organismo hospedeiro para combater a invasão de um corpo estranho (vírus, bactérias, fungos, parasitas) ou a lesão de tecidos, removendo células hospedeiras mortas ou danificadas (Miguel, 2010; Yoo *et al*, 2012).

No processo inflamatório, os macrófagos desempenham um papel importante na resposta e defesa imediata aos organismos estranhos (Medzhitov, 2008; Francisco *et al*, 2011; Yoo *et al*, 2012). Quando ativados por um estímulo inflamatório, tal como lipopolissacarídeos (LPS) da membrana de bactérias Gram-negativas, produzem uma variedade de mediadores, incluindo prostaglandina E₂ (PGE₂) e óxido nítrico (NO). Estes mediadores, durante a resposta inflamatória, são sintetizados em elevadas quantidades devido à ativação das formas induzidas das enzimas ciclooxigenase (COX-2) e sintase do óxido nítrico (iNOS). Por este motivo, a inibição selectiva da COX-2 e iNOS é uma estratégia útil para rastrear novos fármacos anti-inflamatórios (Guzik *et al*, 2003; Lee *et al*, 2010; Francisco *et al*, 2011; Yi *et al*, 2013).

As dificuldades encontradas no tratamento da inflamação, como o aumento da resistência às drogas de síntese, os seus efeitos colaterais, bem como o elevado custo associado, levaram à procura de novos tratamentos, efetivos, mais baratos e menos tóxicos (Zuzarte *et al*, 2013).

Durante vários séculos, extratos de plantas têm vindo a ser usados na medicina tradicional para aliviar as doenças inflamatórias. Várias linhas de investigação têm considerado a atividade anti-inflamatória dos óleos essenciais e/ou dos seus componentes, avaliando os seus efeitos nas cascatas de sinalização da expressão de genes pró-inflamatórios. O efeito anti-inflamatório dos óleos essenciais está relacionado com a sua interferência direta ou indireta com os mediadores de inflamação, como a

inibição da expressão das iNOS e da COX-2 (Calixto *et al*, 2003; Lee *et al*, 2010; Miguel, 2010).

Relativamente aos óleos essenciais de algumas espécies de *Thymus* as propriedades anti-inflamatórias foram apenas estudadas para algumas espécies (Ismaili *et al*, 2004; Albano e Miguel, 2011). De forma a alargar os conhecimentos neste género, no presente trabalho a atividade anti-inflamatória de duas espécies pouco exploradas, *Thymus camphoratus* e *Thymus carnosus*, é avaliada bem como a citotoxicidade dos óleos, num modelo *in vitro* de inflamação, nomeadamente uma linha celular de macrófagos estimulados por LPS.

2. Materiais e Métodos

Todos os ensaios anti-inflamatórios foram realizados no Laboratório de Imunologia Celular e Oncobiologia do Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra.

2.1. Óleos Essenciais

Na avaliação da atividade anti-inflamatória foram usadas duas amostras distintas de óleo essencial de *T. camphoratus* (T1 e T2) e uma amostra de *T. carnosus* (Tc). A proveniência, rendimento em óleo essencial e perfil químico estão reportados na tabela II (capítulo II).

As concentrações dos óleos usadas para a avaliação da atividade anti-inflamatória foram selecionadas tendo em conta os valores de MIC obtidos no ensaio antifúngico, dada a estreita relação entre infeção e inflamação.

2.2. Materiais e Cultura celular

– Lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* (serotipo 026:B6), meio de cultura (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* -DMEM), bicarbonato de sódio, estreptomicina, penicilina e ácido 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazólio

(MTT) foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) e soro bovínico da Invitrogen (Paisley, UK).

A linha celular de macrófagos de rato (Raw 264.7), obtida da *American Type Culture Collection* (TIB-71), foi gentilmente cedida pela Dr.^a Otília 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 10% (v/v) de soro bovínico não ativado, 3.02 g L⁻¹ de bicarbonato de sódio, 100 µg mL⁻¹ de estreptomicina e 100 U mL⁻¹ de penicilina e mantidas a 37°C com 5% de CO₂.

O aspeto morfológico das células foi monitorizado regularmente por observação microscópica. As células foram usadas nos ensaios quando apresentavam 80-90% de confluência. A viabilidade celular foi confirmada por contagem num hemocítmetro (Câmara de Neubauer) utilizando azul de tripano, um corante que apenas penetra células permeabilizadas (inviáveis), corando-as de azul.

2.3. Metodologia

As células (Raw 264.7) foram colocadas em microplacas de 48 poços (MW 48), numa concentração de 0,6x10⁶ por poço, e deixadas a estabilizar durante 12 horas a 37°C com 5% de CO₂. Após este tempo, as células foram cultivadas em meio de cultura sem LPS (controlo), ou em meio de cultura com diferentes concentrações de óleo essencial (0,16-1,25 µg mL⁻¹), durante 24 horas, nas condições de cultura referidas.

2.3.1. Produção de Nitritos

Para testar a influência dos óleos essenciais na produção de NO, um importante mediador no processo inflamatório, foi quantificada a presença de nitritos (metabolitos estáveis do NO) no meio de cultura através de um procedimento colorimétrico com base na reacção de Griess.

Após os tratamentos, 170 µL dos sobrenadantes foram pipetados e misturados com 170 µL de reagente de Griess numa microplaca Elisa 96, e incubados no escuro durante 30 min à temperatura ambiente (Fig. 12). A absorvância foi lida a 550 nm num

leitor de microplacas automático (SLT, Áustria) e a quantidade de nitritos determinada com base numa curva padrão de nitrito de sódio, previamente calculada (Fig. 12+1).

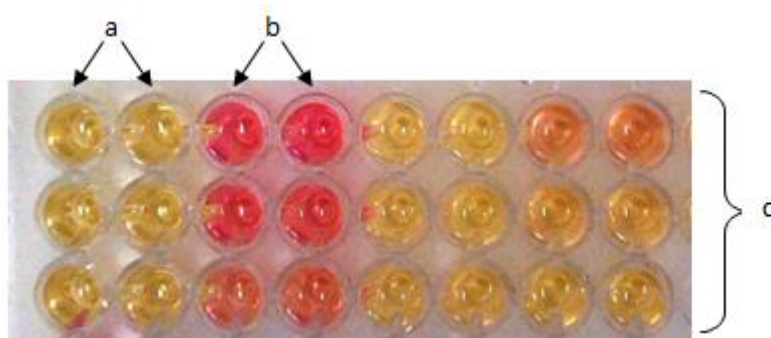


Figura 12. Quantificação da concentração de nitritos no meio de cultura usando o reagente de Griess.: a – controlo; b – células estimuladas com LPS; c – células estimuladas com LPS e tratadas com diferentes concentrações de óleo essencial.

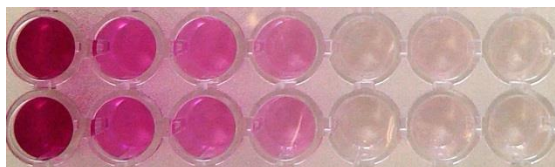


Figura 12+1. Curva padrão de nitrito de sódio para quantificação dos níveis de nitritos.

Todas as experiências foram realizadas três vezes de forma independente, em duplicado e os resultados foram expressos em percentagem de produção de nitritos pelas células na presença de LPS e óleo essencial em relação às células cultivadas só com LPS.

2.3.2. Viabilidade Celular

Para testar a citotoxicidade dos óleos essenciais, foi avaliado o seu efeito na respiração celular, um indicador da viabilidade celular, através do método colorimétrico com brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazóico (MTT), descrito por Mosmann (1983).

Após os tratamentos, 43 μL da solução de MTT (5mg mL^{-1} em tampão fosfato salino) foram adicionados a cada poço da microplaca, e esta foi novamente colocada na estufa a 37°C com 5% de CO_2 , durante 15min. A reação foi parada colocando a microplaca em gelo, e todo o sobrenadante foi aspirado e rejeitado, ficando apenas os cristais de formazano. Para os dissolver, foram adicionados 300 μL de isopropanol acidificado (0.04 N HCL em isopropanol) a cada poço. As soluções foram recolhidas uma microplaca Elisa 96 (Fig. 12+2). A quantificação do formazano foi realizada num leitor de microplacas automático (SLT, Áustria) a 570nm, com um filtro de comprimento de onda de 620nm.

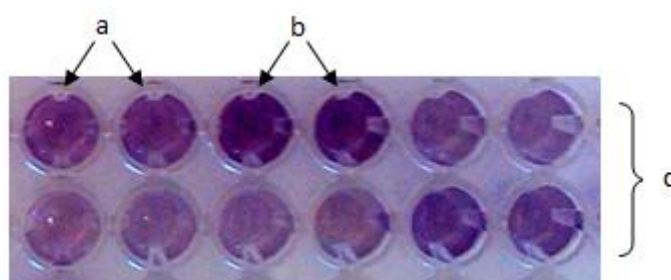


Figura 12+2. Viabilidade celular usando MTT: a – controlo; b – células estimuladas com LPS; c – células estimuladas com LPS e tratadas com diferentes concentrações de óleo essencial.

Todas as experiências foram repetidas três vezes de forma independente, em duplicado. Os resultados foram expressos em percentagem da redução do MTT por células cultivadas com meio de cultura (controlo).

2.4. Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm SEM (erro padrão da média) do número de experiências indicadas. Na análise estatística, realizou-se uma análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do pós-teste de *Dunnnett's*, para comparar o efeito das diferentes concentrações de óleo essencial nas células estimuladas por LPS com as células estimuladas somente com LPS (níveis de significância: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Adicionalmente foi aplicado um test-t, para verificar se o LPS estimulava a produção de nitritos em comparação com o meio de controlo (nível de

significância ### $p < 0,001$). As análises estatísticas foram aplicadas usando GraphPadPrism versão 5.02.

3. Resultados

O NO é um mediador pro-inflamatório produzido em elevadas quantidades durante uma resposta inflamatória. A incubação de macrófagos com LPS, durante 24h, aumenta a produção de NO, mimetizando uma resposta inflamatória no organismo. No presente trabalho o efeito anti-inflamatório (inibição da produção de NO) de duas amostras de óleo essencial de *T. camphoratus* (T1 e T2) e uma amostra de *T. carnosus* (Tc) foi avaliado, estando os resultados apresentados de seguida.

3.1. *Thymus camphoratus* – 1

O óleo essencial de *T. camphoratus* 1 mostrou efeito anti-inflamatório na concentração de $0,32 \mu\text{L ml}^{-1}$, inibindo de forma significativa a produção de NO (Fig. 13) sem afetar a viabilidade celular (Fig. 14). Concentrações superiores do óleo ($1,25 \mu\text{L ml}^{-1}$ e $0,64 \mu\text{L ml}^{-1}$) foram menos seguras, mostrando toxicidade nestas células (Fig. 14).

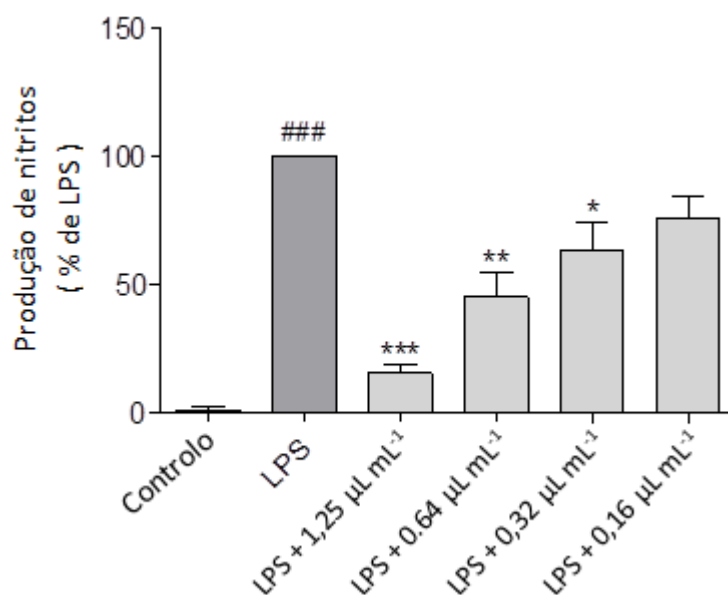


Figura 13. Efeito do óleo essencial de *T. camphoratus* - 1 na inibição da produção de nitritos em macrófagos. Os macrófagos (0.6×10^6 células/poço) foram mantidos em meio de cultura (controlo), ou estimulados com $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de LPS, ou mantidos na presença de LPS com diferentes concentrações de óleo essencial ($0,16$ - $1,25 \mu\text{L mL}^{-1}$), durante 24h. Os resultados foram expressos em percentagem de produção de nitritos pelas células na presença de LPS. Cada valor corresponde à média \pm SEM de três experiências independentes, realizadas em duplicado (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, comparado com LPS; ### $p < 0,001$, comparado com o controlo).

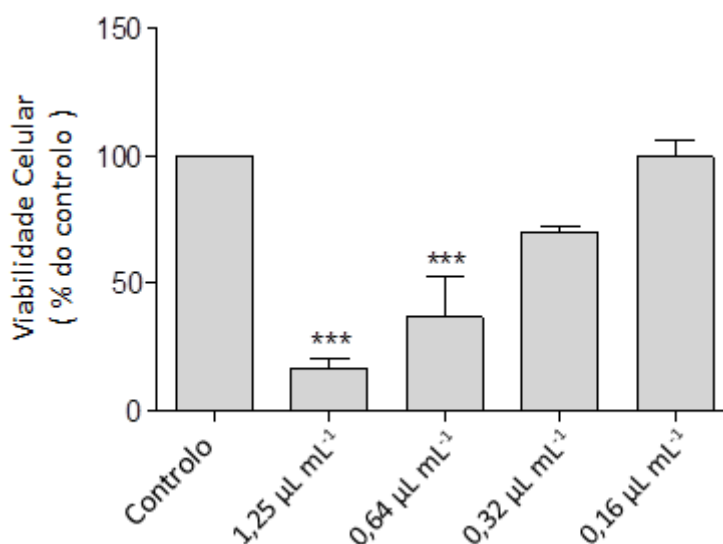


Figura 14. Efeito do óleo essencial de *T. camphoratus* -1 na viabilidade celular de macrófagos (ensaio do MTT). Células Raw 264.7 foram expostas a diferentes concentrações do óleo essencial ($0,16$ - $1,25 \mu\text{L mL}^{-1}$), durante 24h. Os resultados estão expressos em percentagem de redução do MTT por células cultivadas na presença de meio de cultura (controlo). Cada valor corresponde à média \pm SEM de três experiências independentes, realizadas em duplicado (***) $p < 0,001$, comparado com o controlo).

3.2. *Thymus camphoratus* – 2

O óleo essencial de *T. camphoratus* 2 não inibiu a produção de NO (Fig. 15) sem afetar a viabilidade dos macrófagos, nas concentrações testadas (Fig. 16). Desta forma, este óleo não mostrou potencial anti-inflamatório e dos óleos testados, é o que apresenta maior toxicidade, sendo apenas a concentração $0,16 \mu\text{L mL}^{-1}$ considerada segura (Fig. 16).

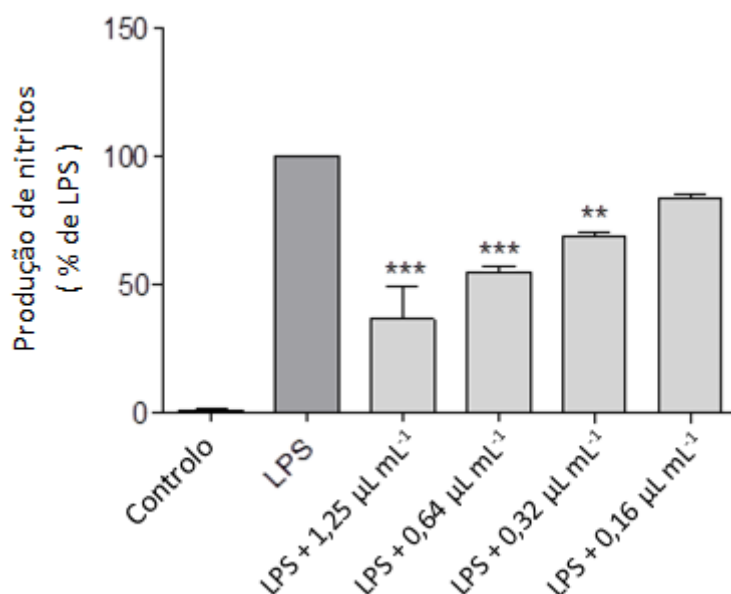


Figura 15. Efeito do óleo essencial de *T. camphoratus* -2 na inibição da produção de nitritos em macrófagos. Os macrófagos ($0,6 \times 10^6$ células/poço) foram mantidos em meio de cultura (controlo), ou estimulados com $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de LPS, ou mantidos na presença de LPS com diferentes concentrações de óleo essencial ($0,16$ - $1,25 \mu\text{L mL}^{-1}$), durante 24h. Os resultados foram expressos em porcentagem de produção de nitritos pelas células na presença de LPS. Cada valor corresponde à média \pm SEM de três experiências independentes, realizadas em duplicado (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, comparado com LPS; ### $p < 0,001$, comparado com o controlo).

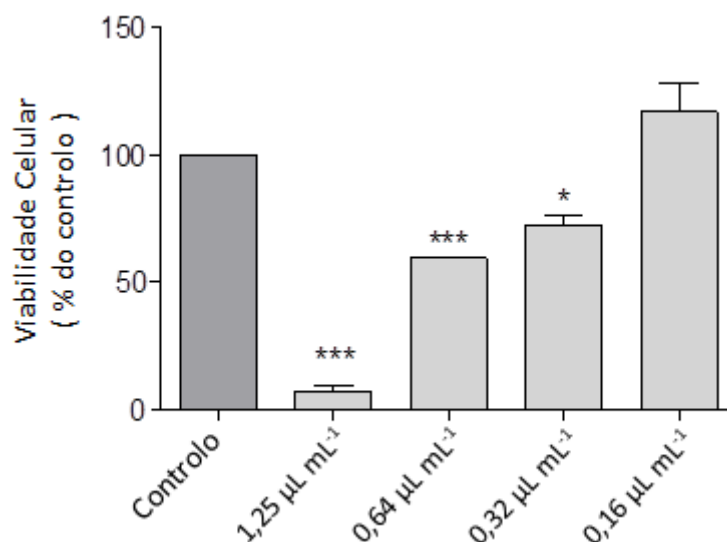


Figura 16. Efeito do óleo essencial de *T. camphoratus* -2 na viabilidade celular de macrófagos (ensaio do MTT). Células Raw 264.7 foram expostas a diferentes concentrações do óleo essencial (0,16-1,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$), durante 24 horas. Os resultados estão expressos em percentagem de redução do MTT por células cultivadas na presença de meio de cultura (Controlo). Cada valor corresponde à média \pm SEM de três experiências independentes, realizadas em duplicado (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, comparado com o controlo).

3.3. *Thymus carnosus*

O óleo essencial de *T. carnosus* inibiu de forma significativa a produção de NO (Fig. 17) sem afetar a viabilidade celular, nas concentrações de 0,64 e 0,32 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (Fig. 18). Na concentração de 1,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$, o óleo mostrou ser ligeiramente tóxico para as células (Fig. 18).

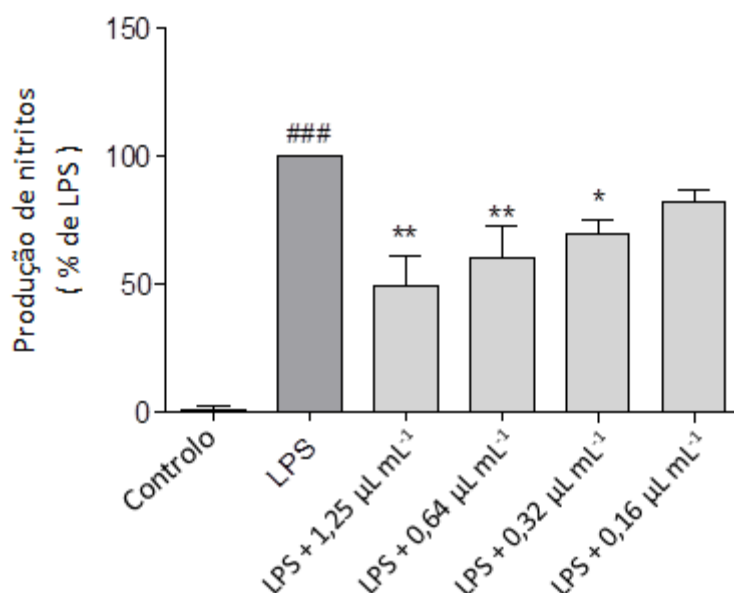


Figura 17. Efeito do óleo essencial de *T. carnosus* na inibição produção de nitritos em macrófagos. Os macrófagos (0.6×10^6 células/poço) foram mantidos em meio de cultura (controlo), ou estimulados com $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de LPS, ou mantidos na presença de LPS com diferentes concentrações de óleo essencial ($0,16$ - $1,25 \mu\text{L mL}^{-1}$), durante 24h. Os resultados foram expressos em percentagem de produção de nitritos pelas células na presença de LPS. Cada valor corresponde à média \pm SEM de três experiências independentes, realizadas em duplicado (* $p < 0,01$ e ** $p < 0,01$, comparado com LPS; ### $p < 0,001$, comparado com controlo).

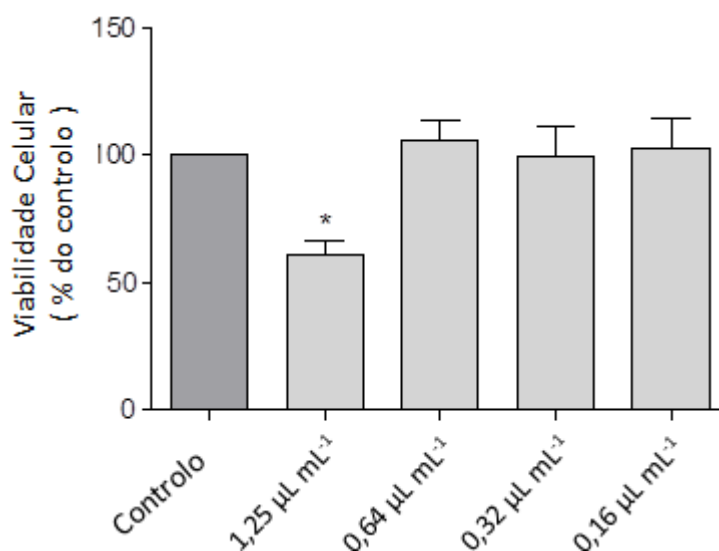


Figura 18. Efeito do óleo essencial de *T. carnosus* na viabilidade celular de macrófagos (ensaio do MTT). Células Raw 264.7 foram expostas a diferentes concentrações do óleo essencial ($0,16$ - $1,25 \mu\text{L mL}^{-1}$), durante 24 horas. Os resultados estão expressos em percentagem da redução do MTT por células cultivadas na presença de meio de cultura (controlo). Cada valor corresponde à média \pm SEM de três experiências independentes, realizadas em duplicado (* $p < 0,05$, comparado com o controlo).

4. Discussão

O efeito anti-inflamatório dos óleos essenciais de diversas espécies de *Thymus* tem sido reportado usando modelos *in vitro* e *in vivo* (Ismaili *et al.*, 2004; Albano e Miguel, 2011; Albano *et al.*, 2012; Zuzarte *et al.*, 2013). No que diz respeito às espécies contempladas neste trabalho, a capacidade de inibição de um mediador da inflamação, a 5-lipoxygenase (Albano e Miguel, 2011; Albano *et al.*, 2012), foi determinada, mostrando que o óleo de *T. camphoratus* foi mais efetivo na inibição da 5-lipoxygenase.

No presente trabalho, foi selecionado um modelo *in vitro* (utilizando uma linha celular de macrófagos), para avaliação do efeito dos óleos essenciais na inibição da produção de NO. O NO, é também um mediador pró-inflamatório, produzido em elevadas quantidades durante os processos inflamatórios. Os macrófagos, quando ativados por um estímulo inflamatório (adição de LPS), expressam a principal enzima envolvida neste processo, a iNOS (Calixto *et al.* 2003). A inibição desta enzima e consequente diminuição dos níveis de NO têm sido considerados na procura de novos agentes anti-inflamatórios (Francisco *et al.*, 2011).

Paralelamente a estes ensaios, a citotoxicidade dos óleos essenciais foi também avaliada de forma a determinar as concentrações bioativas e seguras dos óleos.

Os resultados dos testes efetuados nas duas amostras de *T. camphoratus* evidenciaram a diminuição da produção de nitritos nas concentrações de 0,32 a 1,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$, em comparação com as células apenas estimuladas com LPS. No entanto, a amostra 1 apresentou citotoxicidade a 0,64 e 1,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$ e a amostra 2 apresentou citotoxicidade em todas as concentrações analisadas. Desta forma apenas o óleo *T. camphoratus* 1 na concentração 0,32 $\mu\text{L mL}^{-1}$ mostrou potencial anti-inflamatório. Apesar de as duas amostras apresentarem os mesmos constituintes maioritários na sua composição (borneol, 1,8-cineol, canfeno e α -pineno), estes ocorrem em diferentes concentrações, o que poderá justificar as diferenças na bioatividade e toxicidade determinadas. Estudos anteriores mostraram que óleos que contenham borneol, 1,8-cineol e α -pineno na sua composição revelaram ter boa atividade anti-inflamatória, interferindo ao nível de alguns mediadores, como o NO e PGE₂ (Miguel, 2010). Assim sendo, o facto da amostra 1 ter apresentado melhor atividade pode estar relacionado por ter maior percentagem nestes dois compostos do que a amostra 2. Por outro lado, a

presença de diferentes compostos minoritários e o efeito sinérgico dos diferentes constituintes do óleo também poderá justificar o potencial terapêutico da amostra 1.

Os testes efetuados com o óleo essencial de *T. carnosus* evidenciaram diminuições significativas na produção de nitritos pelas células nas concentrações de 0,32 a 1,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$, em comparação com o controlo (macrófagos estimulados só com LPS). Apesar de se constatar essa diminuição com as concentrações acima referidas, verificou-se pelo ensaio de MTT, que o óleo numa concentração de 1,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$ era citotóxico para as células. Tal resultado evidenciou que a diminuição da produção de nitritos nesta concentração se deve à diminuição de células viáveis e não ao efeito anti-inflamatório do óleo essencial. Assim, apenas as concentrações de 0,32 e 0,64 $\mu\text{L mL}^{-1}$ são bioativas e seguras.

Comparando as três amostras analisadas, o óleo essencial de *T. carnosus* mostrou ser o mais bioativo. Tal facto pode estar relacionado com a sua composição química. Diferente das outras duas amostras, este óleo é composto por terpineno-4-ol, que tal como referido por Miguel (2010), óleos que contenham este composto são bons inibidores ao nível de vários mediadores pró-inflamatórios.

IV: CONCLUSÕES

No presente trabalho, com base numa abordagem multidisciplinar e visando a valorização dos óleos essenciais de *T. camphoratus* e *T. carnosus*, espécies endémicas de Portugal e Península Ibérica, respetivamente, foi possível estudar as suas potencialidades: antifúngica, contra várias estirpes patogénicas para o Homem e outros animais e anti-inflamatória, na inibição de NO, um importante mediador na reacção inflamatória; bem como avaliar a sua citotoxicidade numa linha celular de macrófagos.

Tendo em conta o aumento resistência dos fungos aos fármacos convencionais, bem como os efeitos colaterais destes últimos, principalmente quando administrados com outras drogas, é essencial a procura de novos agentes terapêuticos, eficazes, económicos e que apresentem baixa toxicidade para os pacientes. Os óleos essenciais estudados demonstraram ter atividade antifúngica, especialmente contra a estirpe de *C. neoformans*. Este é um dado bastante promissor tendo em conta a transmissão desta estirpe que facilmente pode atingir o organismo humano. O óleo que apresentou globalmente melhor atividade foi o de *T. camphoratus*.

Na avaliação da inibição do tubo germinativo em *C. albicans*, os três óleos mostraram ser efetivos, especialmente na concentração de $0,64 \mu\text{L mL}^{-1}$, inibindo por completo a sua formação. Atendendo a que a formação do tubo germinativo é um fator importante de patogenicidade na invasão de tecidos, o fato dos óleos essenciais inibirem a sua formação, torna-os potenciais agentes terapêuticos, em casos sistémicos de doentes imunodeprimidos e candidíases assintomáticas.

O efeito dos óleos essenciais de *T. camphoratus* e *T. carnosus* em processos inflamatórios foi avaliado com base na inibição do NO. Os três óleos demonstraram ter atividade anti-inflamatória em concentrações de $0,32$ a $1,25 \mu\text{L mL}^{-1}$, no entanto, no ensaio de viabilidade celular, provou-se que o óleo de *T. carnosus* é o menos tóxico. *T. carnosus* apresenta atividade a $0,32$ e $0,64 \mu\text{L mL}^{-1}$, sem apresentar risco de toxicidade para as células. Desta forma, este óleo pode ser considerado um eventual candidato a agente anti-inflamatório, pois mostrou ser o óleo mais ativo e mais seguro.

V: PERSPETIVAS FUTURAS

O género *Thymus* apresenta uma elevada biodiversidade. Das onze espécies que ocorrem em Portugal algumas apresentam polimorfismo morfológico, sendo possível identificar nessas espécies *taxa* intra-específicos com áreas fitogeográficas diferentes. Deste modo, consideram-se no total catorze *taxa* portuguesas: *T. mastichina* subsp. *mastichina*; *T. mastichina* subsp. *donyanae*; *T. albicans*; *T. caespititius*; *T. lotocephalus*; *T. villosus* subsp. *villosus*; *T. villosus* subsp. *lusitanicus*; *T. carnosus*; *T. zygis* subsp. *zygis*; *T. zygis* subsp. *sylvestris*; *T. capitellatus*; *T. camphoratus*; *T. pulegioides*; *T. praecox* subsp. *ligusticus*. Apenas alguns *taxa* foram já estudados a nível da produção de óleo essencial e avaliação da sua bioatividade. Assim, seria importante dar continuidade a esses estudos e ampliar a investigação aos *taxa* menos conhecidos.

Atendendo aos resultados positivos obtidos na avaliação da atividade anti-inflamatória dos óleos de *T. camphoratus* e *T. carnosus*, seria também interessante testar o seu efeito noutros mediadores pró-inflamatórios, como por exemplo as enzimas iNOS e COX-2, o fator de transcrição nuclear kappa B (Nf- κ B) e as citocinas pró-inflamatórias [fator de necrose tumoral (TNF α) e interleucinas IL-1 e IL-6].

Uma vez que a viabilidade celular foi apenas testada com macrófagos, seria igualmente importante, testar essa viabilidade noutras linhas celulares como por exemplo queratinócitos, de forma a potenciar a sua utilização como agentes antifúngicos e anti-inflamatórios para uso tópico.

VI: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adam, K., Sivropoulou, A., Kokkini, S., Lanaras, T., Arsenakis, M. 1998. *Antifungal activities of Origanum vulgare subsp. hirtum, Mentha spicata, Lavandula angustifolia and Salvia fruticosa essential oils against human patogenic fungi*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 46: 1739-1745.
- Al-Fatimi, M., Wurster, M., Schröder, G., Lindequist, U. 2010. *In vitro antimicrobial, cytotoxic and radical scavenging activities and chemical constituents of the endemic Thymus laevigatus (Vahl)*. Records of Natural Products. 4(1): 49-63.
- Albano, S.M., Miguel, M.G. 2011. *Biological activities of extracts of plants grown in Portugal*. Industrial Crops and Products. 33: 338-343.
- Albano, S.M., Lima, A.S., Miguel, M.G., Pedro, L.G., Barroso, J.G., Figueiredo, A.C. 2012. *Antioxidant, anti-5-lipoxygenase and antiacetylcholinesterase activities of essential oils and decoction waters of some aromatic plants*. Records of Natural Products. 6(1): 35-48.
- 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*. Am.J.Med. 101: 170-176.
- APG III – The Angiosperm Phylogeny Group. 2009. *An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III*. Botanical Journal of the Linnean Society. 161: 105–121.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. 2008. *Biological effects of essential oils – a review*. Food and Chemical toxicology. 46(2): 446-75.
- Bergold, A.M., Georgiadis, S. 2004. *New antifungic drugs: a review*. Visão Académica. 5(2): 159-172.
- Bisio, A., Corallo, A., Gastaldo, P., Romussi, G., Ciarallo, G., Fontana, N., De Tommas, N., Profumo, P. 1999. *Glandular hairs and secreted material in Salvia blepharophylla Brandegge ex Epling Grown in Italy*. Annals of Botany. 83: 441-452.
- Brito, A.R.M.S. 1996. *How to study the pharmacology of medicinal plants in underdeveloped countries*. Journal of ethnopharmacology. 54: 131-8.
- Brizendine, K.D., Baddley, J.W., Pappas, P.G. 2011. *Pulmonary cryptococcosis*. Seminars in respiratory and critical care medicine. 32: 727-734.

- 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.
- Cavalcanti, Y.W., Almeida, L.F.D., Padilha, W.W.N. 2011. *Atividade Antifúngica de três Óleos Essenciais sobre cepas de Candida*. Rev Odontol Bras Central. 20(52).
- Cavalcanti, Y.W., Almeida, L.F.D., Padilha, W.W.N. 2011. *Screening of essential oils' antifungal activity on Candida strains*. Odontol. Clin.-Cient. 10(3): 243-246.
- Calixto, J.B., Otuki, M.F., Santos, A.R.S. 2003. *Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor κ B (NF- κ B)*. Planta Medica. 69: 973-983.
- Celikel, N., Kavas, G. 2008. *Antimicrobial properties of some essential oils against some pathogenic microorganisms*. Czech Journal of Food Sciencies. 26(3): 174-181.
- Cleff, M.B., Meinerz, A.R., Xavier, M., Schuch, L.F., Meireles, M.C.A., Rodrigues, M.R.A., Mello, J.R.B. 2010. *In vitro activity of Origanum vulgare essential oil against Candida species*. Brazilian Journal of Microbiology. 41: 116-123.
- CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standard, third edition M27-A3*. Wayne, PA. USA.
- CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, third informational supplement M27-S3*. Wayne, PA. USA.
- CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved standard, second edition M38-A2*. Wayne, PA. USA.
- Combrinck, S., Du Plooy, G.W., McCrindle, R.I., Botha, B.M. 2007. *Morphology and histochemistry of glandular trichomes of Lippia scaberrima (Verbanaceae)*. Annals of Botany. 99: 1111-1119.
- Council of Europe. 2010. *European Pharmacopoeia, 7th ed.* Council of Europe, Strasbourg.
- Crespí, A. M. L., Pereira Coutinho, A., Aguiar, C., Neto, C., Pinto-Gomes, C., Espírito Santo, D., Dias E., Almeida, J., Honrado, J., Capelo, J., Costa, J. C., Pinto, M. J., Lousã, M., Sequeira, M. P. S. M., Porto, M., Alves, P., Jardim, R. & Silva, R. M. 2011. *Checklist da Flora de Portugal (Continental, Açores e Madeira)*. M.M. de

- Sequeira, D. Espírito-Santo, C. Aguiar, J. Capelo & J. Honrado (eds). Associação Lusitana de Fitossociologia (ALFA). Lisboa.
- Crocco, E.I., Mimica, L.m.J., Muramatu, L.H., Garcia, C., Souza, V.M., Ruiz, L.R.B., Zaitz, C. 2004. *Identification of Candida species and antifungal susceptibility in vitro: a study on 100 patients with superficial candidiasis*. An bras Dermatol. 79(6): 689-697.
- Dahdah, M.J., Sher, R.K. 2008. *Dermatophytes*. Current Fungal Infection Reports. 2: 81-86.
- Dandlen, S.A., Lima, A.S., Mendes, M.D., Miguel, M.G., Faleiro, M.L., Sousa, M.J., Pedro, L.G., Barroso, J.G., Figueiredo, A.C. 2011. *Antimicrobial activity, cytotoxicity and intracellular growth inhibition of portuguese Thymus essential oils*. Brazilian Journal of Pharmacognosy. 21(6): 1012-1024.
- Desalermos, A., Kourkoumpetis, T.K., Mylonakis, E. 2012. *Update on the epidemiology and management of cryptococcal meningitis*. Expert Opinion on Pharmacotherapy. 13: 783-789.
- Dixon, R.A. 2001. *Natural products and plant disease resistance*. Nature. 411(6839): 843-847.
- Edris, A.E. 2007. *Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review*. Phytotherapy Research. 21(4): 308-323.
- Fahn, A. 1988. *Secretory tissues in vascular plants*. New Phytologist. 108: 229-257.
- Faleiro, M.L., Miguel, M.G., Ladeiro, F., Venâncio, F., Tavares, R., Brito, J.C., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G. 2003. *Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of Thymus*. Letters in Applied Microbiology. 36: 35-40.
- Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G. 2007. *Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Mediciniais – Curso Teórico-Prático*. Universidade de Lisboa. Lisboa.
- Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G., Salgueiro, L., Miguel, M.G., Faleiro, M.L. 2008a. *Portuguese Thymbra and Thymus species volatiles: chemical composition and biological activities*. Curr. Pharm. Des. 1: 3120-3140.
- Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G., Scheffer, J.J.C. 2008b. *Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile componentes and essential oils*. Flavour and Fragrance Journal. 23(4), 213-226.

- Francisco, V., Figueirinha, A., Neves, B.M., García-Rodríguez, C., Lopes, M.C., Cruz, M.T., Batista, M.T. 2011. *Cymbopogon citratus* as source of new and safe anti-inflammatory drugs: bio-guided assay using lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*. 133: 818-827.
- Franco, J. A. 1984. *Nova Flora de Portugal (Continente e Açores)*. Vol. II. Sociedade Astória, Lta. Lisboa.
- Gonçalves, M.J., Cruz, M.T., Cavaleiro, C., Lopes, M.C., Salgueiro, L. 2010. *Chemical, antifungal and cytotoxic evaluation of the essential oil of Thymus zygis subsp. Sylvestris*. *Ind.Crop.Prod.* 32: 70-75.
- Gershenzon, J., Maffei, M., Croteau, R. 1989. *Biochemical and histochemical localization of monoterpene biosynthesis in the Glandular Trichomes of Spearmint (Mentha spicata)*. *Plant Physiol.* 89: 1351-1357.
- Gershenzon, J., McCaskill, D., Rajaonarivony, J.I.M, Mihaliak, C., Karp, F., Croteau, R., 1992. *Isolation of secretory cells from plant glandular trichomes and their use in biosynthetic studies of monoterpenes and other gland products*. *Analytical Biochemistry*. 200(1): 130-138.
- Guzik, T.J., Korbut, R., Adamek-Guzik, T. 2003. *Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation*. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 54(4): 469-487.
- Hainer, B.L. 2003. *Dermatophyte infections*. *Practical Therapeutics*. 67: 101-108.
- Hammer, K.A., Carson, C.F., Riley, T.V. 2003. *Antifungal activity of the components of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil*. *Journal of Applied Microbiology*. 95: 853-860.
- Hunter, J.D., Doddi, M. 2010. *Sepsis and the heart*. *British Journal of Anaesthesia*. 104: 3-11.
- Ismaili, H., Milella, L., Fkih-Tetouani, S., Ildrissi, A., Camporese, A., Sosa, S., Altinier, G., Loggia, R.D., Aquino, R. 2004. *In vivo topical anti-inflammatory and in vitro antioxidante activities of two extracts of Thymus satureioides leaves*. *Journal of Ethnopharmacology*. 91: 31-36.
- IPQ-CT5 – Instituto Português da Qualidade. Comissão Técnica 5. Lisboa NP 90. 1987. Óleos essenciais – definição. 5ª edição.
- ISO TC 54 – International Standards Organization. Technical Committee 54. Geneve – ISO 9235. 1997. *Aromatic Natural Raw Materials – Vocabulary*.

- Joy, P.P., Thomas, I., Mathew, S., Skaria, B.P. 1998. *Medicinal Plants*. Agricultural University. Kerala, India.
- Kalemba, D., Kunicka, A. 2003. *Antibacterial and antifungal properties of essential oils*. *Curr.Med.Chem.* 10: 813-829.
- Karaman, S., Digrak, M., Ravid, U., Ilcim, A. 2001. *Antibacterial and antifungal activity of the essential oil of Thymus revolutus Celak from Turkey*. *Journal of Ethnopharmacology*. 76:183-186.
- Khan, M.S.A., Ahmad, I. 2011. *Antifungal activity of essential oils and their synergy with fluconazole against drug-resistant strains of Aspergillus fumigatus and Trichophyton rubrum*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 90: 1083-1094.
- Kordali, S., Cakir, A., Mavi, A., Kilic, H., Yildirim, A. 2005. *Screening of chemical composition and antifungal and antioxidant activities os the essential oils from three Turkish Artemisia species*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 1408-1416.
- Kousha, M., Tadi, R., Soubani, A.O. 2011. *Pulmonary Aspergillosis: a clinical review*. *European Respiratory Review*. 20: 156-174.
- Lahlou, M. 2004. *Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils*. *Phytotherapy Research*. 18:435-448.
- Lee, Y.J., Park, S.Y., Kim, S.G., Park, D.J., Kang, J.S., Lee, S.J., Yoon, S., Kim, Y.H., Bae, Y.S., Choi, Y.W. 2010. *Identification of a novel compound that inhibits iNOS and COX-2 expression in LPS-stimulated macrophages from Schisandra chinensis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 391: 1687-1692.
- Lin X., Heitman, J. 2006. *The biology of the Cryptococcus neoformans species complex*. *Annual Review of Microbiology*. 60:69-105.
- Marichal, P., Gorrens, J., Vancutsem, J., Vandenbossche, H. 1986. *Culture media for the study of the effects of azole derivatives on germ tube formation and hyphal growth of Candida albicans*. *Mykosen*. 29: 76-81.
- Medzhitov, R. 2008. *Origin and physiological roles of inflammation*. *Nature*. 454: 428-435.
- Miguel, M.G., Figueiredo, A.C., Costa, M.M., Martins, D., Duarte, J., Barroso, J.G., Pedro, L.G. 2003. *Effect of the volatile constituents isolated from Thymus albicans, Th.mastichina, Th.carnosus and Thymbra capitata in sunflower oil*. *Nahrung/Food*. 47(6): 397-402.

- Miguel M.G. 2010. *Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review*. *Molecules*. 15: 9252-9287.
- Mondello, F., Bernardis, F., Girolamo, A., Salvatore, G, Cassone, A. 2003. *In vitro and in vivo activity of tea tree oil against azole-susceptible and resistant human pathogenic yeasts*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 51: 1223-1229.
- Mondello, F., Bernardis, F., Girolamo, A., Cassone, A., Salvatore, G. 2006. *In vivo activity of terpinen-4-ol, the main bioactive component of Melaleuca alternifolia Cheel (tea tree) oil against azole-susceptible and resistant human pathogenic Candida species*. *BMC Infections Diseases*. 6: 158.
- Monod, M. 2008. *Secreted proteases from dermatophytes*. *Mycopathologia*. 166: 285-294.
- Morales, L. 1997. *Synopsis of the genus Thymus L. in the Mediterranean area*. *Lagascalia*. 19(1-2): 249-262.
- Morales, R., Quintanar, A., Cabezas, F., Pujadas, A.J., Cirujano, S. 2010. *Flora Ibérica – Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares*. Vol. XII. Real Jardín Botánico, CSIC. Madrid, Espanha.
- Mosmann, T. 1983. *Rapid colorimetric assay for celular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. *Journal of Immunological Methods*. 65: 55-63.
- Mukherjee, P.K., Leidich, S.D., Isham, N., Leitner, I., Ruder, N.S., Ghannoum, M.A. 2003. *Clinical Trichophyton rubrum strain exhibiting primary resistance to terbinafine*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 47: 82-86.
- Naghibi, F., Mosaddegh, M., Motamed, S.M., Ghorbani, A. 2005. *Labiatae family in folk medicine in Iran: from ethnobotany to pharmacology*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 2: 63-79.
- Palmeira-de-Oliveira, A., Salgueiro, L., Palmeira-de-Oliveira, R., Martinez-de-Oliveira, J., Pina-Vaz, C., Queiroz, J.A., Rodrigues A.G. 2009. *Anti-Candida activity of essential oils*. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 9: 1292-1305.
- Panizzi, L., Flamini, G., Cioni, P.L., Morelli, I. 1993. *Composition and antimicrobial properties of essential oils of four Mediterranean Lamiaceae*. *Journal of Ethnopharmacology*. 39(3): 167-170.
- Pereira Coutinho, A.X. 1939. *Flora de Portugal*. Bertrand (Irmãos), Ltd. Lisboa.

- Peres, N.T.A., Maranhão, F.C.A., Rossi, A., Martinez-Rossi, N.M. 2010. *Dermatophytes: host-pathogen interaction and antifungal resistance*. An.Bras.Dermatol. 85(5): 657-667.
- Pfaller, M.A., Diekema, D.J. 2010. *Epidemiology of invasive mycoses in North America*. Critical Reviews in Microbiology. 36: 1-53.
- Philipson, J.D. 2007. *Phytochemistry and Pharmacognosy*. Phytochemistry 68: 2960-2972.
- Pina-Vaz, C., Rodrigues, A.G., Pinto, E., Costa-de-Oliveira, S., Tavares, C., Salgueiro, L., Cavaleiro, C., Gonçalves, M.J., Martinez-de-Oliveira, J. 2004. *Antifungal activity of Thymus oils and their major compounds*. European Academy of Dermatology and Venereology JEADV. 18: 73-78.
- Pinto, E., Pina-Vaz, C., Salgueiro, L., Gonçalves, M.J., Costa-de-Oliveira, S., Cavaleiro, C., Palmeira, A., Rodrigues, A., Martinez-de-Oliveira, J. 2006. *Antifungal activity of the essential oil of Thymus pulegioides on Candida, Aspergillus and dermatophyte species*. Journal of Medical Microbiology. 55: 1367-1373.
- Porta, C, Larghi, P., Rimoldi, M., Totaro, M.G., Allavena, P., Mantovani, A., Sica, A. 2009. *Cellular and molecular pathways linking inflammation and cancer*. Immunobiology. 214: 761-77.
- Proença da Cunha, A., Silva, A.P., Roque, O.R. 2003. *Plantas e Produtos Vegetais em Fitoterapia*. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa.
- Proença da Cunha, A., Ribeiro, J.A., Roque, O.R. 2007. *Plantas aromáticas em Portugal - Caracterização e Utilizações*. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa.
- Proença da Cunha, A. 2009. *Farmacognosia e Fitoquímica*. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa.
- Proença da Cunha, A., Silva, A.P., Roque, O.R. 2009. *Plantas e Produtos Naturais em Fitoterapia*. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa.
- Raikhel, N.V. 2003. *Plant Physiology's Best Paper Award 2012*. Plant Physiology. 132(1): 3.
- Rodrigues, A.G., Mardh, P.A., Pina-Vaz, C., Martinez-de-Oliveira, J., Fonseca, A.F. 1999. *Germ tube formation changes surface hydrophobicity of Candida cells*. Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology. 7: 222-226.
- Salgueiro, L.R. 1994. *Os tomilhos portugueses e seus óleos essenciais*. Tese de Doutoramento. Universidade de Coimbra. Coimbra.

- Salgueiro, L.R., Vila, R., Tomàs, X., Tomi, F., Cañigñeral, S., Casanova, J., Cunha, A.P., Adzet, T. 1995. *Chemical polimorfism of the essential oil of Thymus carnosus from Portugal*. Phytochemistry. 38(2): 391-396.
- Salgueiro, L.R., Vila, R., Tomàs, X., Tomi, F., Cañigñeral, S., Casanova, J., Proença da Cunha, A., Adzet, T. 1997. *Composition and infraspecific variability of essential oil from Thymus camphoratus*. Phytochemistry. 45: 1177-1183.
- Salgueiro, L.R., Pinto, E., Gonçalves, M.J., Pina-Vaz, C., Cavaleiro, C., Rodrigues, A.G., Palmeira, A., Tavares, C., Costa-de-Oliveira, S., Martinez-de-Oliveira, J. 2004. *Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of Thymbra capitata*. Planta Medica. 70: 572-575.
- Salgueiro, L.R., Pinto, E., Gonçalves, M.J., Costa, I., Palmeira, A., Cavaleiro, C., Pina-Vaz, C., Rodrigues, A.G., Martinez-de-Oliveira, J. 2006. *Antifungal activity of the essential oil of Thymus capitellatus against Candida, Aspergillus and dermatophyte strains*. Flavour and Fragrance Journal. 21: 749-753.
- Seigler, D.S. 1998. *Plant Secondary Metabolism*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. Massachusetts, USA.
- Schmidt, M.I., Duncan, B.B. 2003. *Diabesity: an inflammatory metabolic condition*. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 41: 1120-1130.
- Shasany, A.K., Shukla, A.K., Khanuja, S.P.S. 2007. *Medicinal and Aromatic Plants. Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants*. 6: 175-196.
- Sidrim, J.J.C., Moreira, J.L.B. 1999. *Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica*. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. Brasil.
- Sobel, J.D., Muller, G., Buckley, H.R. 1984. *Critical role of germ tube formation in the pathogenesis of candida vaginitis*. Infection and Immunity. 44(3): 576-580.
- Sobel, J.D. 2007. *Vulvovaginal candidosis*. Lancet. 369: 1961-1971.
- Sociedade Portuguesa de Botânica. *Flora-On: Flora de Portugal Interactiva*. Julho 2013. www.flora-on.pt.
- Svoboda, K.P., Svoboda, T.G. 2000. *Secretory structures of aromatic and medicinal plants*. Microscopix Publications. Knighton, UK.
- Taiz, L., Zeiger, E. 2002. *Plant Physiology*. Sinauer Associates. Massachusetts: Sinauer.
- Vale-Silva, L.A., Gonçalves, M.J., Cavaleiro, C., Salgueiro, L., Pinto, E. 2010. *Antifungal activity of the essential oil of Thymus x viciosi against Candida, Cryptococcus, Aspergillus and dermatophyte species*. Planta Medica. 76: 1-7.

- Van der Fits, L., Memelink, J. 2000. *ORCA3, a Jasmonate – responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism*. Science. 289(5477): 295.
- Verpoorte, R., Alfermann, A.W. 2000. *Metabolic engineering of plant secondary metabolism*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands.
- Viollon C., Chaumont, J.P. 1994. *Antifungal properties of essential oils and their main components upon Cryptococcus neoformans*. Mycopathologia. 128: 151-153.
- Wagner, G.J. 1991. *Secreting glandular trichomes: more than just hairs*. Plant Physiol. 96: 675-679.
- Werker, E., Ravid, U., Putievsky E. 1985. *Structure of glandular hairs and identification of the main components of their secreted material in some species of the Labiatae*. Israel Journal of Botany. 34: 31-45.
- Werker, E. 1993. *Function of essential oil-secreting glandular hairs in aromatic plants of the Lamiaceae – a review*. Flavour and Fragrance Journal. 8: 249-255.
- White, T.C., Marr, K.A., Bowden, R.A. 1998. *Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance*. Clinical Microbiology Reviews. 11(2): 382-402.
- Whitney, N.P., Eidem, T.M., Peng, H., Huang, Y., Zheng, J.C. 2009. *Inflammation mediates varying effects in neurogenesis: relevance to the pathogenesis of brain injury and neurodegenerative disorders*. Journal of Neurochemistry. 108: 1343-1359.
- Yi, P.F., Bi, W.Y., Shen, H.Q., Wei, Q., Zhang, L.Y., Dong, H.B., Bai, H.L., Zhang, C., Song, Z., Qin, Q.Q., Lv, S., Wu, S.C., Fu, B.D., Wei, X.B. 2013. *Inhibitory effects of sulfated 20(S)-ginsenoside Rh2 on the release of pro-inflammatory mediators in LPS-induced RAW 264.7 cells*. European Journal of Pharmacology. 712: 60-66.
- Yoo, M.S, Shin, J.S., Choi, H.E., Cho, Y.W., Bang, M.H, Baek, N.I., Lee, K.T. 2012. *Fucosterol isolated from Undaria pinnatifida inhibits lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide and pro-inflammatory cytokines via the inactivation of nuclear factor- κ B and p38 mitogen-activated protein kinase in RAW264.7 macrophages*. Food Chemistry. 135: 967-975.
- Zizovic, I., Stamenic, M., Orlovic, A., Skala, D. 2007. *Supercritical carbon dioxide extraction of essential oils from plants with secretory ducts: Mathematical modeling on the micro-scale*. Journal of Supercritical Fluids. 39: 338-346.

- Zuzarte, M.R. 2007. *Lavandula pedunculata* (Miller) Cav.: estruturas secretoras, óleos essenciais e cultura in vitro. Dissertação de Mestrado. Universidade de Coimbra. Coimbra.
- Zuzarte, M., Gonçalves, M.J., Canhoto, J., Salgueiro, L. 2011. *Antidermatophytic activity of essential oils*. *Formatex*. 1167-1178.
- Zuzarte, M., Gonçalves, M.J., Cruz, M.T., Cavaleiro, C., Canhoto, J., Vaz, S., Pinto, E., Salgueiro, L. 2012. *Lavandula luisieri* essential oil as a source of antifungal drugs. *Food Chemistry*. 135: 1505-1510.
- Zuzarte, M., Gonçalves, M.J., Cavaleiro, C., Cruz, M.T., Benzarti, A., Marongiu, B., Maxia, A., Piras, A., Salgueiro, L. 2013. *Antifungal and anti-inflammatory potential of Lavandula stoechas and Thymus herba-barona essential oils*. *Industrial Crops and Products*. 44:97-103.