



Inês Calado Guerra

CARATERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE *CRITHMUM* *MARITIMUM L.*

Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar, orientada pelo Professor Doutor Artur Manuel Bordalo Machado Figueirinha e pela Professora Doutora Lígia Maria Ribeiro Pires Salgueiro Silva Couto e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

2018



UNIVERSITY OF COIMBRA

Inês Calado Guerra

Caraterização fitoquímica e atividades biológicas de *Crithmum maritimum* L.

Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar, orientada pelo Professor Doutor Artur Manuel Bordalo Machado Figueirinha e pela Professora Doutora Lígia Maria Ribeiro Pires Salgueiro Silva Couto e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho de 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

“Em algum lugar, alguma coisa incrível está à espera de ser descoberta”

Carl Sagan

Agradecimentos

Estando a terminar mais uma fase importante na minha vida, quero mostrar a minha gratidão para com todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta tese.

Aos meus orientadores, porque foi com muito gosto que desenvolvi este projeto. Ao Dr. Artur Figueirinha, pela prontidão e disponibilidade constantes, pela partilha de conhecimento, pela orientação científica e por todo o acompanhamento, preocupação e amizade. À Dra. Lígia Salgueiro, pelo acompanhamento constante, por me incentivar sempre a superar-me a mim própria e pela oportunidade de desenvolver este trabalho com rigor e perseverança.

À Dra. Maria José Gonçalves, por toda a disponibilidade, paciência e pela generosidade com que me transmitiu toda a sua experiência laboratorial.

À Dra. Teresa Cruz, e a todos os elementos da equipa do IBILI por terem proporcionado as condições para realizar os ensaios de atividade anti-inflamatória.

Ao Jorge Silva, por todas as horas passadas no laboratório, por todos os esclarecimentos, dúvidas, desabafos e ainda por todo o apoio científico.

À Patrícia Matos, à Sónia Pedreiro, à Chiara, à Júlia Barbeitos e ao Pedro Marques que me acompanharam durante este ano, proporcionando todo o apoio laboratorial e pessoal, em termos de incentivo e entusiasmo para a conclusão deste projeto.

Às minhas colegas de casa Carina, Luciana, Mariana, Inês, Joana e Ana, por toda a paciência e incentivo, por nunca me terem deixado desistir e por me acompanharem em todas as maratonas de tese.

Às minhas amigas de mestrado Tânia, Catarina, Paula e especialmente à Andrea por ser a companheira de tantas horas em Coimbra, de trabalho e de vida, por me acolher em sua casa e me acompanhar nas dificuldades do dia-a-dia.

À Marta, porque há pessoas na vida que nos inspiram a ser mais e melhor, por nunca ter deixado que duvidasse das minhas capacidades e por ter acreditado em mim desde o primeiro dia.

À Maria Inês e à Sara, porque nunca deixaram de estar presentes, com os conselhos mais sábios e os abraços mais fortes.

À Cátia Caratão, à minha afilhada Márcia, à minha afilhada Cátia e à Ana Martins, por me acompanharem sempre com as palavras certas.

À minha família: avós, padrinhos, tios, primos, à Rita Maltez e família e à Ana Maria, por serem o porto seguro a que volto sempre. Em especial à madrinha, da qual sou uma filha do coração.

À minha irmã, a pequenina que todos os dias me idolatra e se orgulha de tudo o que faço, que nunca permite que desista e me apoia em todos os sonhos.

Aos meus pais, que foram parte integrante neste projeto, porque constituíram a base sólida, permanente e indispensável para que eu conseguisse tudo na vida. Não consigo descrever em palavras a importância de tudo o que sempre fizeram por mim.

E porque o mais importante fica para último, um agradecimento muito especial ao Daniel, que viveu tudo isto comigo, lado a lado. Por todas as coisas que não fizemos, por todas as horas que trabalhamos juntos, por todo o amor que me fez forte e firme durante todo este processo, por ser o melhor companheiro de vida e a melhor inspiração.

A todos, MUITO OBRIGADO!

Índice

Índice de Figuras	XII
Índice de Tabelas	XIV
Abstract	XVI
Resumo	XVIII
Lista de abreviaturas	XX
I. INTRODUÇÃO	I
I.1 Considerações gerais.....	3
I.2 Plantas medicinais e aromáticas.....	3
I.3 Família Apiaceae.....	5
I.3.1 Género <i>Crithmum</i>	6
I.3.1.1 Espécie em estudo: <i>Crithmum maritimum</i> L.....	6
I.3.1.1.1 Descrição botânica.....	6
I.3.1.1.2 Distribuição.....	8
I.3.1.1.3 Etnobotânica	8
I.3.1.1.4 Composição química.....	9
I.3.1.1.5 Bioatividades	12
OBJETIVOS.....	15
2. CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA.....	17
2.1 Introdução.....	19
2.1.1 Óleos essenciais	19
2.1.2 Compostos fenólicos.....	20
2.1.2.1 Fenóis simples.....	20
2.1.2.2 Ácidos fenólicos	21
2.1.2.3 Flavonóides.....	22
2.2 Material e métodos	23
2.2.1 Material vegetal.....	23
2.2.2 Obtenção do óleo essencial e caracterização química	23
2.2.3 Obtenção da AHD e caracterização fitoquímica	24
2.2.3.1 Cromatografia em camada fina (TLC).....	24
2.2.3.2 TLC preparativa	26

2.2.3.3 Cromatografia Líquida de Alta Resolução com detetor de fotodíodos (HPLC-PDA)	26
2.3 Resultados e Discussão	27
2.3.1 Óleo essencial	27
2.3.2 Água de Hidrodestilação (AHD).....	28
2.3.2.1 Análise da AHD por TLC	28
2.3.2.2 Análise da AHD por HPLC/DAD e TLC preparativa	29
3. ATIVIDADE ANTIFÚNGICA	35
3.1 Introdução.....	37
3.1.1 Candidíases	38
3.1.2 Criptococoses.....	40
3.1.3 Aspergiloses.....	40
3.1.4 Dermatofitoses	41
3.2 Material e métodos	42
3.2.1 Estirpes fúngicas.....	42
3.2.2 Avaliação da atividade antifúngica.....	43
3.2.3 Mecanismo de ação.....	44
3.2.3.1 Inibição do tubo germinativo	45
3.2.3.2 Avaliação do efeito do OE na formação de biofilmes de <i>C. albicans</i>	45
3.2.3.3 Avaliação do efeito do OE nos biofilmes pré-formados de <i>C. albicans</i>	46
3.2.3.3.1 Quantificação da biomassa pelo ensaio de cristal violeta.....	47
3.2.3.3.2 Avaliação da viabilidade pelo ensaio de metabolização de XTT	47
3.3 Resultados e discussão	48
3.3.1 Avaliação da Atividade Antifúngica.....	48
3.3.2 Inibição do tubo germinativo.....	50
3.3.3 Inibição da formação de biofilmes de <i>C. albicans</i>	52
3.3.4 Inibição dos biofilmes pré-formados de <i>C. albicans</i>	54
4. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	55
4.1 Introdução.....	57
4.2 Material e métodos	59
4.2.1 Método de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo).....	60
4.2.2 Método bioautográfico.....	60
4.3 Resultados e Discussão	60
5. ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA	63

5.1 Introdução.....	65
5.2 Material e Métodos	66
5.2.1 Linhas celulares.....	66
5.2.2 Avaliação do potencial anti-inflamatório de óleo e AHD in vitro.....	67
5.2.3 Avaliação da viabilidade celular	67
5.3 Análise estatística.....	67
5.4 Resultados e discussão	68
6. CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS.....	71
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

Índice de Figuras

Figura 1: <i>Crithmum maritimum</i>	7
Figura 2: Distribuição mundial de <i>C. maritimum</i>	8
Figura 3: Distribuição de <i>C. maritimum</i> em Portugal Continental.....	8
Figura 4: Compostos referidos na literatura como maioritários em óleos essenciais de <i>C. maritimum</i>	11
Figura 5: exemplos de fenóis simples.....	21
Figura 6: exemplos de ácidos fenólicos do tipo hidroxibenzóico.....	21
Figura 7: exemplos de ácidos fenólicos do tipo hidroxicinâmico.....	21
Figura 8: exemplo de um flavonóide e referência aos anéis A, B e C.....	22
Figura 9: exemplos de estruturas das principais classes de flavonóides.....	22
Figura 10: Extração do óleo essencial por hidrodestilação com aparelho de Clevenger.....	23
Figura 11: Evaporador rotativo, a pressão reduzida: concentração da AHD obtida após hidrodestilação da planta.....	24
Figura 12: Perfil TLC da AHD por observação a 366 nm sem revelação com NP-PEG (a) e após revelação com NP-PEG (b).....	28
Figura 13: Perfil cromatográfico HPLC/DAD da AHD de <i>C. maritimum</i> , registado a 280 nm (verde) e a 320 nm (vermelho).....	30
Figura 14: Espectros UV dos compostos fenólicos presentes na AHD de <i>C. maritimum</i> , obtidos <i>on line</i> por HPLC/DAD.....	31
Figura 15: Perfil HPLC-PDA das amostras obtidas após a TLC preparativa, registado a 280 nm (verde) e a 320 nm (vermelho).	32
Figura 16: Biomassa do biofilme de <i>C. albicans</i> após tratamento com o óleo essencial.	52
Figura 17: Viabilidade do biofilme de <i>C. albicans</i> após tratamento com o óleo essencial. O gráfico a) refere-se a uma cultura de 24h e o b) de 48h, usando o ensaio de XTT.....	53
Figura 18: Reação de neutralização do radical DPPH.....	59
Figura 19: Detecção de compostos antioxidantes por pulverização de TLC com DPPH.	61
Figura 20: Efeito do OE de <i>C. maritimum</i> na produção de nitritos por macrófagos estimulados com LPS (a) e na sua viabilidade celular (b).	68

Índice de Tabelas

Tabela 1: Síntese descritiva de algumas plantas da família Apiaceae, referindo espécie, nome comum, utilizações etno-medicinais, e compostos do óleo essencial, adaptada de Sayed-Ahmad <i>et al.</i> (2017).	6
Tabela 2: Compostos majoritários do óleo essencial de <i>C. maritimum</i> , respetiva origem e referência.....	10
Tabela 3: Composição em fenólicos de extratos de folhas de <i>C. maritimum</i>	11
Tabela 4: Fator de retenção (Rf) das várias manchas observadas na TLC da AHD	29
Tabela 5: Tentativa de identificação das classes de compostos presentes na AHD de <i>C. maritimum</i> , considerando o tempo de retenção e o $\lambda_{\text{máximo}}$	30
Tabela 6: Tempos de retenção obtidos para os padrões de ácidos fenólicos analisados	32
Tabela 7: Infecções fúngicas e espécies que as originam, respetiva localização e taxas de mortalidade, adaptado de Brown <i>et al.</i> (2012).....	38
Tabela 8: Estirpes de Referência, respetiva origem e referência	42
Tabela 9: Estirpes isoladas clinicamente, respetiva origem e referência	42
Tabela 10: Atividade antifúngica (MIC e MLC) da AHD, do óleo essencial de <i>C. maritimum</i> e dos seus compostos majoritários (γ -terpineno e sabineno) contra estirpes de <i>Candida</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> , dermatófitos e <i>Aspergillus</i>	49
Tabela 11: Percentagem de filamentação de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 em concentrações sub-inibitórias do óleo essencial de <i>C. maritimum</i> e do fluconazol.....	50
Tabela 12: Percentagem de filamentação de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 em concentrações sub-inibitórias dos compostos majoritários do OE de <i>C. maritimum</i>	51
Tabela 13: Atividade antioxidante da água de hidrodestilação de <i>C. maritimum</i>	61
Tabela 14: Atividade anti-inflamatória do OE e da água de hidrodestilação de <i>C. maritimum</i> .69	

Abstract

Crithmum maritimum is a plant of the Apiaceae family, typical of the Mediterranean zone, used as fresh food, in traditional medicine and with more recent applications in the cosmetic industry. Its potential uses are not fully described scientifically, and it is therefore justified to extend its study. However, there are already some biological activities associated with its essential oil. In this context, the objective of this work was to evaluate the essential oil (EO) as well as the hydrodistillation residual water (HRW), rich in phenolic compounds, not only for its chemical characterization but also for the evaluation of its antioxidant, anti-inflammatory and antifungal activities.

The EO was obtained by hydrodistillation and the HRW resulting from this extraction process was subjected to vacuum evaporation and freeze-drying and was later characterized by thin layer chromatography (TLC) and high resolution chromatography with photodiode detection (HPLC-DAD). HRW showed a profile rich in hydroxycinnamic phenolic acids and small amounts of flavonoids. The EO characterization was obtained by GC and GC-MS and allowed the identification of γ -terpinene, sabinene and thymol methyl ether as major constituents.

The antifungal properties of the EO and HRW were evaluated for yeast and filamentous fungi (*Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, dermatophytes and *Aspergillus* spp.), known as pathogens of prevalent fungal pathologies. The evaluation of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum lethal concentration (MLC) allowed us to conclude that *C. maritimum* EO has a significant activity, especially in *Cryptococcus neoformans* (with MIC of 0.26 mg / mL and MLC of 0.52 mg/mL), *Epidermophyton floccosum* and *Microsporum canis* (MIC and MLC with a value of 0.52 mg/mL). In addition, the oil has proved to inhibit the germ tube and biofilm formation of *C. albicans*, suggesting a potential interest of *C. maritimum* essential oil for the treatment of candidiasis, associated with the presence of its major compounds. AHD demonstrated no antifungal activity for the strains tested (MIC and MLC > 5 mg/mL).

Considering that data from previous studies highlighted the low antioxidant activity of EO and a relevant antioxidant potential for extracts of non-volatile compounds associated with the presence of chlorogenic acid, a study of antioxidant activity was conducted based on the neutralizing capacity of the radical DPPH only for HRW. As a result, the extract presented an IC₅₀ value of 0.68 ± 0.16 mg/mL. The study also demonstrated that this activity is essentially due to the presence of phenolic acids, mainly chlorogenic acid but also to the flavonol present in the extract.

The anti-inflammatory activity, for which there was no study in either the EO or phenolic extracts of *C. maritimum*, was evaluated. The results allowed to conclude that EO presented an IC₅₀ of 0.01225 ± 0.00192 mg/mL. The essential oil significantly reduced the production of nitric oxide in LPS-stimulated macrophages at a concentration of 0.003 mg/mL without compromising cell viability. This activity of EO can be attributed to the activity of the major compounds, since these have also shown to have activity. Regarding HRW, it has not shown any anti-inflammatory activity.

In conclusion, this work allowed to evaluate for the first time the anti-inflammatory potential of the essential oil of *C. maritimum*, as well as its antifungal activity with respect to the virulence factors of *C. albicans*. It also allowed to demonstrate, for the first time, the phenolic composition of HRW, as well as its biological potential with respect to its antioxidant activity. These results highlight the importance of the reuse of water resulting from the extraction process of the essential oil of *C. maritimum* as a source of bioactive compounds, thus giving an additional value to this aromatic plant. The whole study evidences the possibility of a greater use of *Crithmum maritimum*, with food and healthcare applications.

Key words: *Crithmum maritimum*, essential oil, hydrodistillation residual water, phenolic compounds, anti-fungal, anti-inflammatory, antioxidant

Resumo

Crithmum maritimum é uma planta da família Apiaceae, típica da zona do Mediterrâneo, usada como alimento fresco, na medicina tradicional e com aplicações mais recentes na indústria cosmética. As suas potenciais utilizações não estão totalmente descritas cientificamente, pelo que se justifica ampliar o seu estudo. Contudo, há já algumas atividades biológicas associadas ao seu óleo essencial. Neste contexto, o objetivo deste trabalho consistiu em valorizar o óleo essencial (OE) bem como a água residual da hidrodestilação (AHD), rica em compostos fenólicos, não só pela sua caracterização química como também pela avaliação das suas atividades antioxidante, anti-inflamatória e anti-fúngica.

O OE foi obtido por hidrodestilação e a AHD resultante deste processo extrativo foi sujeita a evaporação a vácuo e liofilização, tendo sido posteriormente caracterizada com recurso a cromatografia em camada fina (TLC) e cromatografia de alta resolução com deteção de fotodíodos (HPLC-DAD). A AHD evidenciou um perfil rico em ácidos fenólicos do tipo hidroxicinâmico e pequenas quantidades de flavonóides. A caracterização do OE foi obtida por GC e GC-MS e permitiu identificar como constituintes maioritários γ -terpineno, sabineno e timol metil éter.

Foram avaliadas as propriedades antifúngicas do OE e da AHD no que diz respeito a leveduras e fungos filamentosos (*Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, dermatófitos e *Aspergillus* spp.), conhecidos como agentes patogénicos de patologias fúngicas prevalentes. A avaliação da concentração mínima inibitória (MIC) e da concentração letal mínima (MLC) permitiu concluir que o OE de *C. maritimum* tem uma atividade significativa, especialmente em *Cryptococcus neoformans* (com MIC de 0.26 mg/mL e MLC de 0.52 mg/mL), *Epidermophyton floccosum* e *Microsporum canis* (MIC e MLC com valor de 0.52 mg/mL). Adicionalmente o óleo demonstrou inibir o tubo germinativo e a formação de biofilmes de *C. albicans*, sugerindo um potencial interesse do óleo essencial de *C. maritimum* para o tratamento de candidíase, associado à presença dos seus compostos maioritários. A AHD demonstrou não exercer atividade antifúngica para as estirpes testadas (MIC e MLC >5 mg/mL).

Tendo em conta que dados de estudos prévios sublinhavam a atividade antioxidante diminuta do OE e um potencial antioxidante de relevância para extratos de compostos não voláteis, associados à presença de ácido clorogénico, fez-se um estudo de atividade antioxidante baseado na capacidade de neutralização do radical DPPH apenas para a AHD, tendo o extrato apresentado um valor de IC₅₀ de 0.68 ± 0.16 mg/mL. O estudo realizado

demonstrou também que esta atividade é essencialmente devida à presença de ácidos fenólicos, principalmente ao ácido clorogénico mas também ao flavonol presente no extrato.

A atividade anti-inflamatória, relativamente à qual não havia qualquer estudo nem em OE nem em extratos fenólicos de *C. maritimum*, foi avaliada. Os resultados permitiram concluir que o OE apresentou um IC_{50} de 0.01225 ± 0.00192 mg/mL. O óleo essencial reduziu significativamente a produção de óxido nítrico em macrófagos estimulados com LPS a uma concentração de 0.003 mg/mL sem comprometer a viabilidade celular. Esta atividade do OE poderá ser atribuída à atividade dos compostos maioritários, já que estes demonstraram também ter atividade. Relativamente à AHD, esta não demonstrou ter atividade anti-inflamatória.

Em conclusão, este trabalho permitiu avaliar pela primeira vez o potencial anti-inflamatório do óleo essencial de *C. maritimum*, bem como a sua atividade antifúngica no que diz respeito aos fatores de virulência de *C. albicans*. Permitiu ainda evidenciar, pela primeira vez, a composição fenólica da AHD, bem como o seu potencial biológico no que diz respeito à sua atividade antioxidante. Estes resultados salientam a importância do reaproveitamento da água resultante do processo de extração do óleo essencial de *C. maritimum*, como fonte de compostos bioativos, atribuindo assim um valor adicional a esta planta aromática. Todo o estudo evidencia a possibilidade de uma maior utilização de *Crithmum maritimum*, com aplicações alimentares e medicinais.

Palavras-chave: *Crithmum maritimum*, óleo essencial, água de hidrodestilação, compostos fenólicos, anti-fúngico, anti-inflamatório, antioxidante

Lista de abreviaturas

AHD:	Água residual de hidrodestilação
ATCC:	American Type Culture Collection
CECT:	Colección Española de Culturas Tipo
CLSI:	Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais
COX:	Ciclooxigenase
CV:	Cristal Violeta
DMSO:	Dimetilsulfóxido
DPPH:	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
eNOS:	NOS endotelial
GC:	cromatografia gasosa
GC-MS:	cromatografia gasosa acoplada a espetrometria de massa
HPLC:	cromatografia líquida de alta eficiência
iNOS:	NOS indutível
LPS:	Lipopolissacarídeo
MIC:	Concentração Mínima Inibitória
MLC:	Concentração Letal Mínima
MOPS:	Ácido 3-(N-morfolino)-propanossufónico
nNOS:	NOS neuronal
NO:	óxido nítrico
NOS:	óxido nítrico sintase
NYP :	N-acetil-D-glucosamina, Yeast Nitrogen Base, Prolina
OE:	óleo essencial
PDA:	Potato Dextrose Agar
PGs:	Prostaglandinas
ROS:	Espécies reativas de oxigénio
RPMI:	Roswell Park Memorial Institute
SDA:	Sabouraud Dextrose Agar
UV:	Ultravioleta
YPD:	Yeast Peptone Dextrose

I.INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

Na sociedade ocidental, os consumidores estão cada vez mais conscientes dos benefícios da adoção de um estilo de vida saudável e de bons hábitos alimentares. A opção pelo natural como mais saudável, a preferência por um processamento mínimo dos alimentos e o aumento do consumo de suplementos alimentares à base de plantas, a par da maior preocupação com aditivos sintéticos tem conduzido, nos últimos anos, a um aumento da utilização das plantas aromáticas e medicinais (Nieto, 2017). Acresce ainda uma preocupação ambiental, com o aumento do consumo de produtos com baixo impacto sobre o meio ambiente (Ivanova *et al*, 2005).

O aumento do interesse dos consumidores não se limita à procura de alimentos mais saudáveis, como também a uma busca por maior diversidade de géneros alimentícios capazes de aumentar o bem-estar físico e mental e também a prevenção do aparecimento de doenças crónicas, como cancro, diabetes e doenças cardiovasculares (Oliveira e Cardoso, 2010; Norum, 2005). Prevê-se que até 2050 as necessidades alimentares mundiais venham a aumentar significativamente devido não só ao aumento da população, mas também a uma melhor e maior ingestão alimentar (FAO, 2009). Para além da necessidade de aumentar a produtividade agrícola é necessário torná-la mais sustentável. Assim, a contínua procura de plantas edíveis torna-se uma alternativa fundamentada no conceito de sustentabilidade.

Também a investigação na área das plantas medicinais tem vindo a aumentar, particularmente no que se refere à caracterização de extratos e ao isolamento de novos constituintes ativos, bem como na avaliação das suas propriedades biológicas que podem ter um potencial interesse nas indústrias alimentar, cosmética e farmacêutica (Kuppusamy *et al*, 2014; Pandey *et al*, 2011).

1.2 Plantas medicinais e aromáticas

O registo da utilização de plantas aromáticas e medicinais pelo Homem remonta ao início da história da Humanidade. A sua utilização como alimento, medicamento ou aromatizante veio reconhecer desde logo a estas plantas algumas propriedades de relevância, que foram sendo estudadas ao longo do tempo (Burley, Youngquist e Evans, 2004).

As plantas constituem, desde sempre, o principal meio a que a Humanidade recorreu para tratar doenças. Inicialmente, de modo empírico, este processo tinha por base a experimentação, reconhecendo e sinalizando as plantas, por atividade e toxicidade (Petrovska, 2012).

Hoje em dia, a utilização das plantas na terapêutica continua a ser um meio importante de combate a doenças em todo o mundo, tendo em conta que os medicamentos à base de plantas representam, nos países em desenvolvimento, cerca de 80% dos medicamentos consumidos (Proença da Cunha *et al.*, 2010).

O incremento da utilização de produtos da saúde à base de plantas que se observou nas últimas décadas, é fruto de uma investigação cada vez maior e assenta em parâmetros de qualidade, eficácia e segurança, fatores essenciais para uma confiança crescente por parte do consumidor (Proença da Cunha *et al.*, 2012).

A problemática da qualidade, no caso de medicamentos à base de plantas, é particularmente importante para as indústrias que as utilizam, mas também para o consumidor final, porque uma qualidade inapropriada tem sempre implicações, nomeadamente em termos da atividade biológica do produto final. (Proença da Cunha *et al.*, 2010). Também a aceitabilidade de produtos de saúde à base de plantas se justifica por um longo historial de utilização das mesmas e por, muitas vezes, se observarem menos efeitos secundários do que nos fármacos de síntese (Waqar e Shaukat, 2006).

As propriedades terapêuticas das plantas devem-se aos seus metabolitos secundários e/ou primários., O metabolismo primário refere-se à produção de compostos essenciais e universais, presentes em todos os organismos vivos e fundamentais para a sua sobrevivência, tais como os hidratos de carbono, os lípidos, as proteínas e os ácidos nucleicos, produzidos a partir de processos como a fotossíntese e a respiração (Máthé, 2015).

Os metabolitos secundários, tanto quanto se sabe, não são essenciais à vida mas definem a capacidade de sobrevivência de cada espécie no ecossistema em que se encontra inserida. São produzidos através de vias biossintéticas diferentes das usadas na produção de metabolitos primários e estas são, muitas vezes, características de uma família ou género particular e estão relacionadas com o mecanismo de evolução das espécies. O metabolismo secundário dá origem à formação de diversos compostos, quimicamente distintos, como terpenos, saponinas, heterósidos cardiotónicos, compostos fenólicos e alcalóides (Svoboda e Greenaway, 2003).

É de salientar que o metabolismo primário e secundário estão interligados, na medida em que é o metabolismo primário que fornece as moléculas que servem de base ao metabolismo secundário (Bratt, 2000). Os metabolitos secundários foram durante muito tempo considerados como sub-produtos metabólicos ou desperdício, sem outra função aparente que não fosse o armazenamento de carbono em excesso sobrando do processo da fotossíntese. No entanto, hoje sabe-se que estes metabolitos secundários das plantas podem

desempenhar funções de defesa (contra herbívoros, microorganismos ou plantas competitivas) ou de sinalização (atraindo polinizadores ou dispersores de sementes) e também funções fisiológicas variadas (regulação do crescimento, proteção das radiações UV), sendo responsáveis pela grande maioria das atividades biológicas das plantas (Máthé, 2015).

1.3 Família Apiaceae

A família Apiaceae é uma das famílias mais importantes das espermatófitas, composta por cerca de 3780 espécies, divididas em 434 géneros. Está distribuída por todo o mundo, desde as regiões temperadas do Norte até zonas de altitudes elevadas nos trópicos (Sayed-Ahmad et al., 2017).

A maioria das Apiaceae são plantas aromáticas e apresentam algumas características comuns, tais como folhas alternas, caules ocos, inflorescências com umbelas simples ou compostas, flores de pequenas dimensões, e frutos indeiscentes (Christensen, L.; Brandt, 2006). O odor característico destas plantas deve-se ao seu óleo essencial, que pode ser produzido em diversos órgãos, tais como frutos, sementes e flores (Shelef, 2003).

Esta família inclui um elevado número de taxa com uma vasto campo de aplicação, nomeadamente, nas indústrias alimentar, farmacêutica, cosmética, para além do seu uso na medicina tradicional, como repelente de insetos e como corante (Sayed-Ahmad et al., 2017).

As plantas da família Apiaceae são ricas em diversos metabolitos secundários, como terpenóides, saponinas triterpénicas, flavonóides, cumarinas, poliacetilenos e esteróides, que são potenciais fontes de novos fármacos. Várias espécies são excelentes fontes de óleos essenciais, em que já foram identificados muitas centenas de compostos, com elevado interesse farmacêutico. Os óleos essenciais das Apiaceae revelaram ter atividades biológicas de interesse, como propriedades antimicrobiana, anti-inflamatória, analgésica, antioxidante, diurética, anti-obesidade e anti-tumoral (Sayed-Ahmad et al., 2017).

Na tabela I estão enunciados alguns exemplos de plantas da família Apiaceae, bem como as suas utilizações frequentes e os seus compostos ativos. É de salientar que há compostos e utilizações medicinais comuns entre as várias plantas apresentadas.

Tabela 1: Síntese descritiva de algumas plantas da família Apiaceae, referindo espécie, nome comum, utilizações etno-medicinais, e compostos do óleo essencial, adaptada de Sayed-Ahmad *et al.* (2017).

Espécies	Nome comum	Utilizações etno-medicinais	Composto principal O.E.(%)	Outros compostos	Referências
<i>Cuminum cyminum</i> L.	Cominho	Antiespasmódico; carminativo; adstringente; distúrbios digestivos e respiratórios	Cuminaldeído (27-50)	Sabineno, β -terpineol, γ -terpineno, α -pineno	Koppula, S., Choi, (2011); Sowbhagya, (2013)
<i>Carum carvi</i> L.	Alcaravia	Carminativo, tratamento do eczema, distúrbios gastrointestinais e pneumonias	Carvona (76.8-80.5)	Limoneno, α -pineno, γ -terpineno, p -cimeno	Laribi <i>et al.</i> , (2009)
<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	Funcho	Transtornos gastrointestinais e neurológicos, cálculos renais, vômitos, diarreia	<i>trans</i> -Anetol (69.7-78.3)	Fenchona, estragol, <i>d</i> -limoneno	Díaz-Maroto <i>et al.</i> , (2006); Ghanem <i>et al.</i> , (2012)
<i>Coriandrum sativum</i> L.	Coentro	Doenças gástricas, bronquite, gota; distúrbios gastrointestinais	Linalol (30-80)	γ -terpineno, β -pineno, <i>m</i> -cimeno, citronelal	Mahendra and Bisht (2011); Rajeshwari and Andallu (2011)
<i>Pimpinella anisum</i> L.	Anis	Tratamento de epilepsia, problemas do trato respiratório e asma	<i>trans</i> -Anetol (77-94)	eugenol, estragol, anisaldeído,	Orav <i>et al.</i> , (2008); Pavlova <i>et al.</i> , (2006)
<i>Anethum graveolens</i> L.	Endro	Carminativo, diurético, alívio de soluços e cólicas em bebês	Carvona (30-60)	limoneno, α -felandreno, pineno, cineol,	Ishikawa <i>et al.</i> , (2002); Rădulescu <i>et al.</i> (2010)
<i>Petroselinum crispum</i> Mill.	Salsa	Tratamento da hipertensão, doenças cardíacas e do trato urinário	Miristicina	α -pineno, β -pineno, ρ -cimeno, apiol	Soliman <i>et al.</i> , (2015); Stankovic <i>et al.</i> , (2004)
<i>Crithmum maritimum</i> L.	Funcho do mar	Efeito estimulante, diurético, vermífugo. Tratamento de cistites, prostatites e cólicas.	γ -Terpineno	Sabineno, dilapiol, p -cimeno	Kulisic-Bilusic <i>et al.</i> , (2010); Nabet <i>et al.</i> , (2017)

1.3.1 Género *Crithmum*

1.3.1.1 Espécie em estudo: *Crithmum maritimum* L.

1.3.1.1.1 Descrição botânica

Crithmum maritimum é uma planta aromática espontânea da família Apiaceae e a única espécie do género *Crithmum*. É uma planta perene muito ramificada, com folhas penatissetas, carnudas, triangulares, com contorno e caules de 14 a 15 cm, lenhosos na base. As folhas mais próximas do solo têm pecíolos longos e bainhas ligeiramente apertadas; as folhas

superiores são ligeiramente menores do que as inferiores, com pecíolos curtos e bainhas que envolvem completamente o caule. Possui umbelas que engrossam e frequentemente prolongam a frutificação. (Knees, 2003)

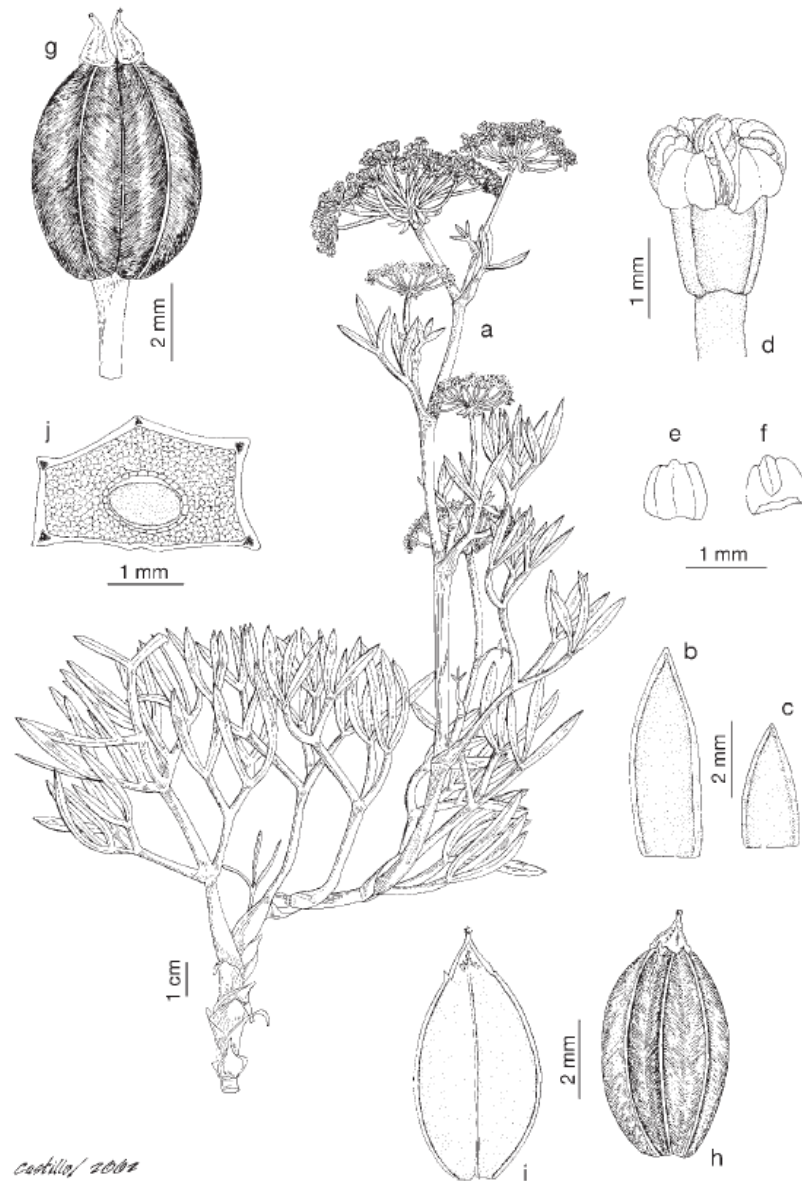


Figura 1: *Crithmum maritimum*. a) hábito, b) bráctea, c) bractéola, d) flor, e) pétala: face externa, f) pétala: face interna, g) fruto, h) mericarpo: face dorsal, i) mericarpo: face comissural, j) visão transversal do mericarpo, in <http://flora-on.pt/index.php?q=Crithmum> consultado a 25/06/2018

Todas as partes da planta (raiz, caule, folhas, flores e frutos) são aromáticas, o que lhe confere um forte aroma (Marongiu *et al*, 2007). Tal como o aipo e a salsa, também da família Apiaceae, *C. maritimum* tem características organolépticas interessantes, como um ligeiro sabor salgado e um aroma leve de aipo, funcho e casca de citrinos verdes, que se mantêm fortes após a ingestão (Renna e Gonnella, 2012).

Comummente conhecida como funcho do mar ou safira das rochas, esta planta é um halófito facultativo e, assim, naturalmente tolerante ao sal (Meot-Duros e Magné, 2009).

1.3.1.1.2 Distribuição

A sua distribuição geográfica estende-se por toda a costa Atlântica Europeia, Açores, Madeira, ilhas Canárias, costa Mediterrânica, Mar Negro, Noroeste de África e Oeste da Ásia, tal como podemos observar pela análise da figura 2 (Nguir *et al*, 2011).



Figura 2: Distribuição mundial de *C. maritimum*,

in <http://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Crithmum+maritimum>,
consultado a 16/02/2018

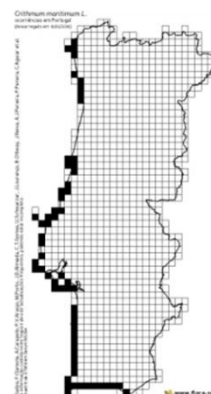


Figura 3: Distribuição de *C. maritimum*
em Portugal Continental, in <http://flora-on.pt>

/#1Crithmum+maritimum, consultado a 16/02/2018

C. maritimum cresce em zonas rochosas, sob a influência da maresia característica dos locais onde vegeta. O seu período de floração varia entre Maio e Outubro (Nguir *et al*, 2011) e o amadurecimento do fruto dá-se entre Novembro e Dezembro (Atia *et al*, 2011).

1.3.1.1.3 Etnobotânica

Em muitos países, *C. maritimum* é usado tradicionalmente como alimento fresco, uma vez que tem características sensoriais interessantes (Renna e Gonnella, 2012), associadas à quantidade de óleo essencial que contém (Ozcan *et al*, 2001; Pateira *et al*, 1999).

As folhas frescas podem ser usadas na preparação de saladas, sopas e molhos, ou ser mantidas em vinagre, como pickle. Esta última preparação está registada como um produto agroalimentar tradicional da Puglia (sul da Itália) pelo Ministério da Agricultura italiano. Nas ilhas britânicas, "Rock Samphire Hash" ou "Picado de funcho-do-mar" é uma receita tradicional preparada pela mistura de caules e folhas de *C. maritimum* em vinagre (Atia *et al*, 2011).

A utilização do funcho do mar na alimentação é muito antiga. Desde os primeiros registos que a utilização desta planta na medicina popular está associada aos seus efeitos estimulantes, diuréticos e como vermífugo. Para além disso, os marinheiros costumavam ingerir folhas frescas de funcho do mar como proteção contra o escorbuto durante as suas viagens. É ainda referido que, em Itália, há registos de que a decocção desta planta tenha sido usada no tratamento de cistite, prostatite e cólicas, e a sua infusão utilizada para o alívio de doenças do foro digestivo (Atia *et al*, 2011).

C. maritimum tem sido amplamente utilizado para fins nutricionais e medicinais, tendo em conta que as suas folhas são ricas em vários compostos, como vitamina C, carotenóides, flavonóides e outras substâncias bioativas. O facto de as sementes conterem quantidades apreciáveis de óleo edível, rico em ácidos gordos essenciais, também evidencia a relevância desta planta (Zarrouk *et al*, 2004).

O óleo essencial de *C. maritimum* também é usado na formulação de cosméticos (Nguir *et al*, 2011). Além disso, as suas propriedades biológicas já foram reconhecidas, com a introdução de produtos patenteados pela indústria cosmética (Block e Wagner, 2005) e pela indústria agro-alimentar (Tramier, G; Helmlinger, 1991).

O facto de o funcho do mar ser uma planta aromática sugere a sua utilização, não só como produto fresco, mas também como planta seca. A indústria alimentar tem vindo a desenvolver todo um mercado de plantas aromáticas secas, que podem ser usadas como ingredientes únicos ou para a obtenção de misturas de especiarias (como caril em pó) e misturas de temperos. Neste contexto de novas misturas de temperos, a introdução de uma nova planta aromática seca no mercado poderá ser benéfica, tanto pelo seu aroma como pela coloração que poderá conferir aos alimentos, funcionando como um aditivo alimentar. Embora o uso culinário de funcho do mar seco em algumas receitas já tenha sido referido, o mercado para a comercialização deste produto ainda é escasso (Renna *et al.*, 2017).

1.3.1.1.4 Composição química

Tendo em conta o potencial etnofarmacológico, alimentar e económico de *C. maritimum*, torna-se essencial aprofundar o conhecimento no que diz respeito ao perfil químico desta planta medicinal, percebendo as variações a que poderá estar sujeito.

No que diz respeito ao óleo essencial, sabe-se que podem verificar-se alterações na composição química, de acordo com a variação da época e a zona geográfica de cultivo. Na

tabela 2 estão apresentados diversos estudos nos quais foi analisado o óleo essencial de *C. maritimum*, especificando os compostos maioritários e a origem da planta.

Tabela 2: Compostos maioritários do óleo essencial de *C. maritimum*, respetiva origem e referência

Origem	Compostos maioritários	Referência
1. Croácia	Limoneno (74.2%), γ -terpineno (13.8%), sabineno (8.1%)	(Generalic Mekinic et al., 2016)
2. Croácia	Limoneno (58.37%), sabineno (26.46%), terpineno-4-ol (5.59%)	(Kulusic-Bilusic et al., 2010)
3. Portugal (Costa da Caparica)	Sabineno (35.3%), γ -terpineno (30%), timol metil éter (20%), (Z)- β -Ocimeno (4%)	(Barroso et al., 1992)
4. Portugal (S. Pedro de Moel)	γ -terpineno (41.5%), sabineno (16,2%), timol metil éter (14.9%), ρ -cimeno (7.5%)	(Marongiu et al., 2007)
5. Portugal (Figueira da Foz)	Dilapiol (34%), γ -terpineno (27.1%), timol metil éter (13.7%), sabineno (6.8%)	(Marongiu et al., 2007)
6. Turquia (Antalya)	β -felandreno (30%), timol metil éter (24.6%), (Z)- β -Ocimeno (14.3%), ρ -cimeno (12.8%)	(Senatore, Napolitano e Ozcan, 2000)
7. Turquia (Mersin)	γ -terpineno (24.3%), dilapiol (20.6%), β -felandreno (13.7%), sabineno (11.7%)	(Senatore, Napolitano e Ozcan, 2000)
8. Turquia (Silifke e Bodrum)	Sabineno, limoneno, (Z)- β -Ocimeno, γ -terpineno , ρ -cimeno	(Ozcan et al., 2001)
9. Itália (Sicília)	Timol metil éter (25%), γ -terpineno (23%), limoneno (22%)	(Ruberto et al., 2000)
10. Itália (Sardenha)	Dilapiol (41%), γ -terpineno (29.8%), β -felandreno (13.3%)	(Marongiu et al., 2007)
11. Tunísia	γ -terpineno (39.3%), metil carvacrol (21,6%), dilapiol (19.7%), ρ -cimeno (11.8%)	(Nguir et al., 2011)

A figura 4 ilustra alguns dos principais compostos reportados para óleos essenciais de *C. maritimum* de várias origens.

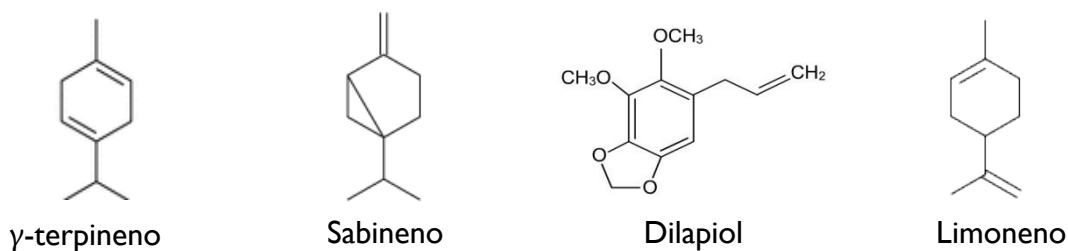


Figura 4: Compostos referidos na literatura como maioritários em óleos essenciais de *C. maritimum*

Além do que está reportado na tabela 2, no que respeita a Portugal, estudos de Pateira *et al.* (1999) revelaram a existência de dois quimiotipos do OE de *C. maritimum* em Portugal, que diferem entre si essencialmente pela percentagem de dilapiol, sendo que o quimiotipo 1 apresenta uma percentagem de dilapiol entre os 15 e os 47% enquanto que, para o quimiotipo 2, a percentagem de dilapiol varia entre 0-6%.

No que se refere aos compostos fenólicos identificados em extratos de *C. maritimum*, Meot-Duros e Magné (2009) referem que esta planta é, de todas as Apiaceae, a mais rica em ácido clorogénico. A presença de ácido clorogénico como o composto fenólico maioritário em extratos de *C. maritimum* é referida em vários estudos (Meot-Duros, Floch e Magné, 2008; Ruberto *et al.*, 2000; Meot-Duros e Magné, 2009; Siracusa *et al.*, 2011), sendo que este composto está presente nas folhas de *C. maritimum*, acumulando-se maioritariamente durante a fase de crescimento e floração da planta (Meot-Duros e Magné, 2009).

Na tabela 3 são apresentados estudos que referem a composição em fenólicos de extratos de folhas de *C. maritimum*.

Tabela 3: Composição em fenólicos de extratos de folhas de *C. maritimum*

Fenóis simples	Ácidos Fenólicos	Flavonóides	Referências
Pirocatecol	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico Ácido 5-cafeoilquínico Ácido 4-cafeoilquínico Ácido 3-cafeoilquínico Ácido cumárico Ácido ferúlico Ácido gálhico	Epicatequina	(Pereira <i>et al.</i> , 2017)

-	Ácido 3-cafeoilquínico Ácido 5-cafeoilquínico Ácido 1-cafeoilquínico Ácido 5- <i>p</i> -cumaroilquínico Ácido 5-feruloilquínico Ácido 3,4-dicafeoilquínico Ácido 3,5-dicafeoilquínico Ácido 4,5-dicafeoilquínico	-	(Siracusa <i>et al.</i> , 2011)
-	Ácido 3-cafeoilquínico Ácido 3-cumaroilquínico Ácido 5-cafeoilquínico Ácido 1-cafeoilquínico Ácido 5-cumaroilquínico Ácido 5-feruloilquínico Ácido <i>cis</i> -5-cumaroilquínico Ácido 3,4-dicafeoilquínico Ácido 3,5-dicafeoilquínico Ácido 4,5-dicafeoilquínico	-	(Nabet <i>et al.</i> , 2017)

Pela análise dos estudos que referem a composição fitoquímica de extratos de *C. maritimum* evidencia-se notoriamente a presença de ácidos fenólicos. São ainda referidos, menos frequentemente, fenóis simples e flavonóides.

1.3.1.1.5 Bioatividades

C. maritimum é uma planta aromática de elevado interesse em termos alimentares, cosméticos e medicinais, como já foi referido anteriormente, sendo consumida maioritariamente em países do Mediterrâneo. O seu possível impacto medicinal e aromático tem despertado interesse e curiosidade na comunidade científica, o que releva a existência de diversos estudos, com o objetivo de clarificar os mecanismos biológicos inerentes aos benefícios farmacológicos e alimentares desta planta aromática.

Relativamente à atividade antimicrobiana, Marongiu *et al.* (2007) sugerem que o seu óleo essencial é ativo contra estirpes de dermatófitos, *Candida albicans*, *Candida guilliermondii* e *Cryptococcus neoformans*, associando uma maior atividade ao OE com níveis mais elevados

de dilapiol. Estudos de Nabet (2017) revelam a atividade antimicrobiana do OE em *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, associando esta atividade às concentrações dos compostos majoritários do OE.

De acordo com Meot-Duros e Magné (2008), o extrato apolar de *C. maritimum* não é ativo em espécies de *Listeria*, mas revela atividade em *Micrococcus luteus*, *Salmonella arizonae*, *Bacillus cereus*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Erwinia carotovora* e espécies de *Pseudomonas*. Este mesmo estudo revela que o extrato polar desta planta é menos ativo do que o apolar, sendo ativo apenas em *Salmonella arizonae* e espécies de *Pseudomonas*.

A atividade antioxidante de *C. maritimum* é referida em diversos estudos, associada a extratos da planta ricos em compostos fenólicos, uma vez que os estudos feitos em OE referem uma atividade muito diminuta (Generalic Mekinić *et al.*, 2016). De acordo com Nabet (2017), foram realizados estudos em radicais ABTS e DPPH e é referido que a atividade antioxidante desta planta poderá estar associada aos níveis de ácido clorogénico e de outros ácidos hidroxicinâmicos que compõem o seu extrato hidro-metanólico.

Siracusa *et al.* (2011) referem atividade antioxidante significativa de infusões de *C. maritimum*, verificando-se uma boa capacidade de neutralização de radicais livres quando comparada com antioxidantes comerciais. Esta atividade antioxidante é atribuída ao ácido clorogénico presente nas infusões.

Relativamente à atividade inibidora da acetilcolinesterase estudada por Nguir *et al.* (2011), é referido que o OE é moderadamente ativo.

São também atribuídas a *C. maritimum* atividades biológicas de replente e inseticida, referidas por Tsoukatou (2001). Relativamente à atividade repelente é sugerido que esteja associada aos compostos voláteis do OE, sendo que a atividade inseticida é atribuída maioritariamente à presença de dilapiol.

Pavela *et al.* (2017) referiram ainda que o quimiotipo do OE caracterizado pela presença de dilapiol e miristicina é eficaz como larvicida contra *S. littoralis* e *C. quinquefasciatus*. A presença de monoterpenos como o γ -terpineno também é importante para justificar os efeitos inibitórios observados.

OBJETIVOS

Crithmum maritimum é uma planta com um vasto campo de aplicação, embora algumas das suas atividades não estejam ainda validadas cientificamente.

Assim, o trabalho desenvolvido nesta tese de mestrado pretende contribuir para clarificar algumas das propriedades biológicas desta planta, colhida em Portugal, nomeadamente do seu óleo essencial e da água resultante da hidrodestilação (AHD), um subproduto da obtenção do óleo essencial, com vista à sua valorização económica. Para este efeito, procedeu-se a:

- Determinação dos principais compostos do óleo essencial por GC e GC-MS;
- Avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial:
 - Determinação do MIC e MLC para vários microrganismos patogénicos, nomeadamente leveduras (*Candida albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondi*, *C. parapsilosis* and *Cryptococcus neoformans*), estirpes de dermatófitos (*Trichophyton mentagrophytes*, *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, *T. verrucosum*, *T. rubrum*, *Microsporum canis*, *M. gypseum*, *Epidermophyton floccosum*) e estirpes de *Aspergillus* (*A. niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*);
 - Determinação da capacidade de inibição da formação do tubo germinativo de *C. albicans*;
 - Determinação da capacidade de inibição da formação de biofilmes de *C. albicans*;
 - Determinação da capacidade de destruição dos biofilmes pré-formados de *C. albicans*;
- Determinação do perfil fenólico da AHD obtida como subproduto da obtenção do óleo essencial por TLC e HPLC-PDA;
- Avaliação da atividade antifúngica da AHD, pela determinação do MIC e MLC relativamente a vários microrganismos patogénicos, nomeadamente leveduras (*Candida albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondi*, *C. parapsilosis* and *Cryptococcus neoformans*), estirpes de dermatófitos (*Trichophyton mentagrophytes*, *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, *T. verrucosum*, *T. rubrum*, *Microsporum canis*, *M. gypseum*, *Epidermophyton floccosum*) e estirpes de *Aspergillus* (*A. niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*);
- Avaliação da atividade antioxidante da AHD, recorrendo à capacidade de neutralização do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo);

- Avaliação da atividade anti-inflamatória do óleo essencial e da AHD em macrófagos estimulados com LPS, através da quantificação da inibição da produção de óxido nítrico (ensaio de Griess). Nestas células também é avaliada a viabilidade celular (ensaio da resazurina).

A avaliação de todas estas propriedades biológicas, tanto do óleo essencial como da AHD, releva as possíveis utilizações de *C. maritimum* em termos de aplicabilidade nas diversas indústrias, salientando também uma possível aposta nesta planta como um potencial alimento funcional.

2. CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA

2.1 Introdução

2.1.1 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são misturas complexas de compostos voláteis produzidos e acumulados em estruturas secretoras especializadas, tais como células secretoras, tricomas, bolsas e canais. De acordo com as normas ISO 9235:2013 (ISO 9235, 2013) da *International Organization for Standardization on Essential Oils* (ISO TC 54, 1997), define-se um óleo essencial como o produto obtido a partir de uma matéria-prima natural de origem vegetal, por arrastamento de vapor de água, por processos mecânicos a partir do epicarpo de citrinos, ou por destilação a seco, após separação da fase aquosa, caso exista, por processos físicos. De acordo com o modo como a água e o vapor são utilizados, distinguem-se três tipos de destilação, nomeadamente, a destilação em água (hidrodestilação), a destilação em água com arrastamento de vapor de água e a destilação por arrastamento por vapor de água (Proença da Cunha, 2006).

Os óleos essenciais são misturas de compostos lipofílicos de baixo peso molecular, voláteis, usualmente com um forte odor, raramente corados, solúveis em solventes orgânicos e muito pouco solúveis em água (Asbahani *et al*, 2015).

Os óleos essenciais são considerados como fonte de sinais químicos que permitem à planta controlar e regular o ambiente envolvente (Bruneton, 2009). Podem variar em qualidade e quantidade, de acordo com fatores intrínsecos, associados a variações sexuais, sazonais, ontogenéticas e genéticas, e extrínsecos, associados a aspetos ecológicos e ambientais. As variações genéticas podem resultar na expressão de vias metabólicas diferentes, resultando em variações quantitativas e/ou qualitativas na composição do óleo essencial. Assim, pode haver plantas que são morfologicamente semelhantes e sexualmente compatíveis, o que do ponto de vista biológico permite concluir tratar-se de um mesmo taxon, no entanto, os seus óleos essenciais podem apresentar composição química diversa, o que permite considerá-los taxa químicos intraespecíficos, variedades químicas ou quimiotipos (Zuzarte e Salgueiro, 2015; Svoboda e Greenaway, 2003).

Os terpenos de baixo peso molecular são os compostos mais frequentes e abundantes nos óleos essenciais, no entanto, outros compostos de natureza não terpénica, como por exemplo, fenilpropanóides, podem também estar presentes em concentrações significativas (Bakkali *et al.*, 2008).

As plantas aromáticas e os óleos essenciais têm um vasto campo de aplicação, não só pelas suas características sensoriais, o que lhes confere um enorme potencial na perfumaria

ou na indústria agro-alimentar, mas também pelas suas propriedades medicinais, e, ainda, como ponto de partida para a síntese de outros compostos. Deste modo, são considerados produtos naturais muito valiosos em diversas áreas, nomeadamente, nas indústrias farmacêutica, alimentar, agronómica, perfumaria e cosmética (Bakkali et al., 2008).

2.1.2 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos têm uma larga distribuição no reino vegetal e são abundantes na dieta humana, pela sua presença em diversos alimentos e pela sua utilização como conservantes alimentares. Estes compostos são metabolitos secundários que desempenham funções relevantes na fisiologia das plantas e, além disso, possuem propriedades potencialmente bioativas para o organismo humano, atuando nomeadamente como antioxidantes, anti-inflamatórios, antimicrobianos ou anticancerígenos (Daglia, 2012).

Os efeitos benéficos para a saúde humana que poderão advir do consumo de polifenóis irão depender da quantidade consumida e da sua biodisponibilidade no organismo (Manach et al., 2004). Os compostos fenólicos têm na sua estrutura química base um anel aromático com um ou mais grupos hidroxilo diretamente ligados (Shahidi e Nacz, 2004; Tsao, 2010). Estes compostos apresentam grande diversidade estrutural, podendo ser classificados em diversas subclasses em função do número de anéis fenólicos que contêm e dos elementos estruturais que os ligam (Fresco et al., 2006; Manach et al., 2004).

Na grande maioria das vezes, os compostos fenólicos estão presentes nas plantas sob a forma de glicósidos, associados a ácidos orgânicos ou como moléculas polimerizadas complexas, com peso molecular elevado (Daglia, 2012).

São apresentadas, de seguida, algumas das classes de compostos fenólicos relevantes para este trabalho, tendo em conta que se referem aos compostos fenólicos encontrados em estudos prévios de extratos de *C. maritimum*.

2.1.2.1 Fenóis simples

Os fenóis simples são os compostos fenólicos mais abundantes na natureza. Na natureza são, geralmente, derivados do pirogalhol ou do floroglucinol (tri-hidroxilados), podendo também encontrar-se di-hidroxilados, como o catecol (Figura 5).

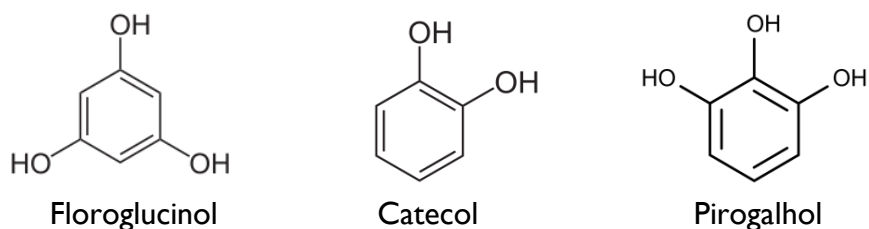


Figura 5: exemplos de fenóis simples

2.1.2.2 Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos são compostos polifenólicos que podem subdividir-se em derivados do ácido benzóico, os ácidos hidroxibenzóicos, ou derivados do ácido cinâmico, os ácidos hidroxicinâmicos ou fenilpropanóides.

Os ácidos hidroxibenzóicos (Figura 6) caracterizam-se pela presença de um grupo carboxilo ligado ao fenol (esqueleto C6-C1) e podem ocorrer sob a forma de polímeros ou esterificados com oses. O teor destes compostos é geralmente reduzido em plantas usadas na alimentação, mas apresentam uma concentração considerável em determinados alimentos, como amoras, framboesas e chá (Manach *et al.*, 2004).



Figura 6: exemplos de ácidos fenólicos do tipo hidroxibenzóico

Relativamente aos ácidos hidroxicinâmicos (Figura 7), a função carboxilo está inserida numa cadeia lateral tricarbonada que, por sua vez, está ligada ao fenol (estrutura C6-C3) (Vermerris e Nicholson, 2006). As formas mais frequentes destes compostos são os derivados glicosilados ou ésteres de ácido quínico, chiquímico ou tartárico (Al-Dashti *et al.*, 2018). Estes ácidos estão presentes na grande maioria das plantas, nomeadamente em frutos (Fraga, 2010).

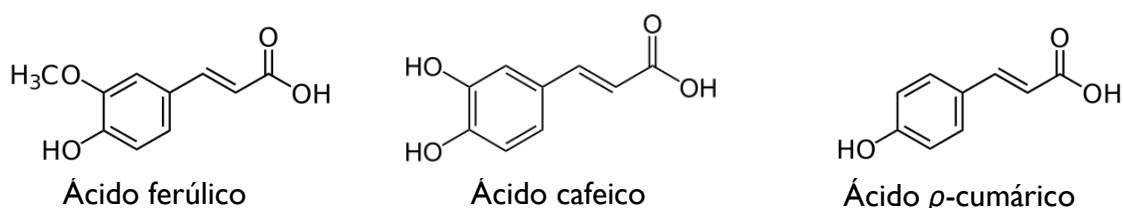


Figura 7: exemplos de ácidos fenólicos do tipo hidroxicinâmico

2.1.2.3 Flavonóides

Os flavonóides são compostos que possuem um núcleo com 15 carbonos, estruturados na forma C6-C3-C6. Estes compostos têm na sua estrutura dois anéis aromáticos (A e B), ligados por uma cadeia de três carbonos que pode eventualmente ciclizar e formar um terceiro anel C (Figura 8).

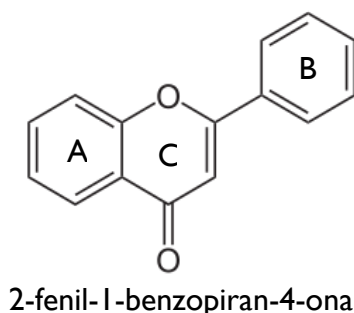


Figura 8: exemplo de um flavonóide e referência aos anéis A, B e C

O estado de oxidação e de insaturação/saturação do anel C, bem como a posição do anel B, vão originar as diferentes subclasses de flavonóides: antocianidinas, flavonóis, flavanonas, flavonas e flavanóis (Manach *et al.*, 2004). Na natureza, os flavonóides aparecem frequentemente glicosilados, ou substituídos com grupos metilo. As glicosilações podem ser do tipo O, em que as oses se encontram ligadas à genina por intermédio de um átomo de oxigénio (neste caso a posição de glicosilação ocorre num dos hidroxilos fenólicos), ou então do tipo C, em que as oses se encontram ligadas à genina por intermédio de um átomo de carbono.

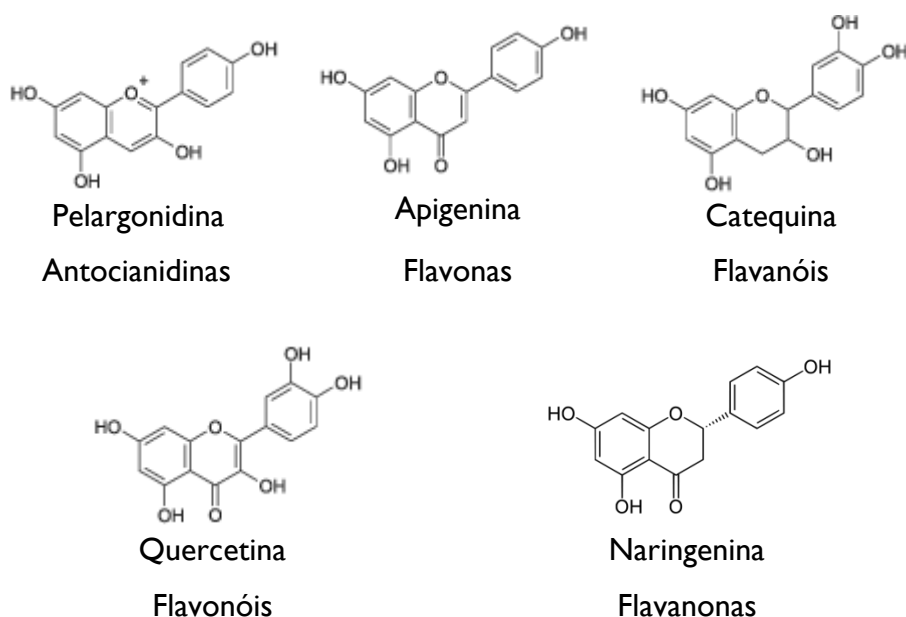


Figura 9: exemplos de estruturas das principais classes de flavonóides

2.2 Material e métodos

2.2.1 Material vegetal

Partes aéreas floridas de *Crithmum maritimum* foram recolhidas em Nazaré, Portugal (39°36'16.9"N 9°04'44.4"W), a 19 de Julho de 2017.

Após a recolha, a planta foi mantida em ambiente seco durante 24 horas e submetida a um processo extrativo para a obtenção do óleo essencial e da AHD. Um exemplar testemunho foi depositado no Herbário de Plantas Medicinais da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

2.2.2 Obtenção do óleo essencial e caracterização química

O óleo essencial de *C. maritimum* foi obtido através de um processo de hidrodestilação, com recurso ao aparelho de Clevenger, em que a planta é colocada diretamente em contacto com a água fervente, durante 3 horas, de acordo com o procedimento descrito pela Farmacopeia Europeia (Council of Europe, 2010).

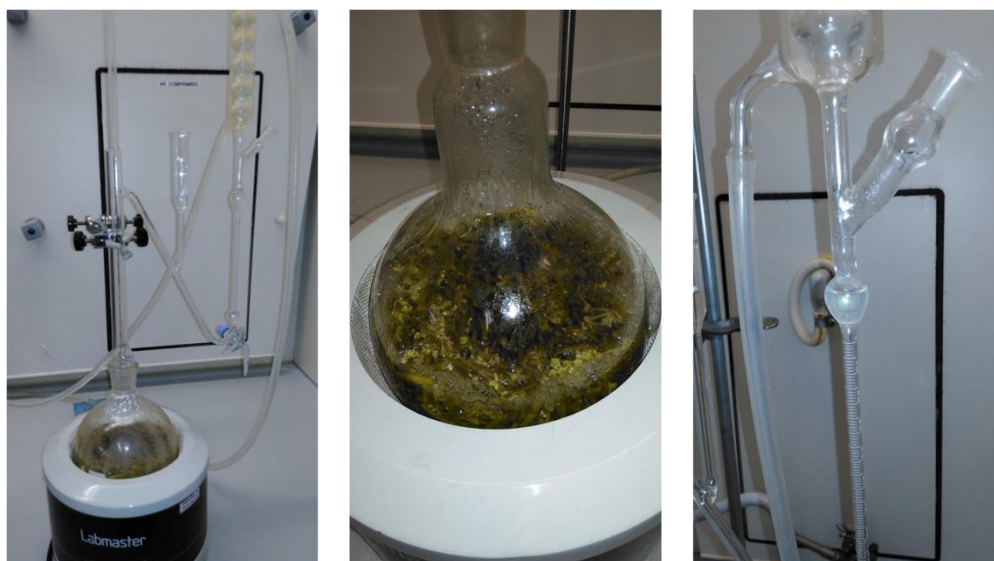


Figura 10: Extração do óleo essencial por hidrodestilação com aparelho de Clevenger

A caracterização química do óleo essencial foi obtida em estudos prévios realizados no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, por cromatografia gás-líquido (GC) e por cromatografia gás-líquido acoplada a espectrometria de massa (GC-MS). Os compostos foram identificados pelos seus índices de retenção e pelos respetivos espetros de massa.

2.2.3 Obtenção da AHD e caracterização fitoquímica

De acordo com o que foi referido anteriormente, no processo extrativo dos óleos essenciais a planta é colocada diretamente em contacto com a água fervente e submetida a uma hidrodestilação. A nível industrial, essa água residual da destilação costuma ser rejeitada após a produção do óleo. Contudo, durante o processo de hidrodestilação, muitos compostos solúveis podem ser extraídos, tornando essa água rica em outro tipo de metabolitos, não voláteis, com potencial valor industrial. Assim, esta água foi também objeto de estudo neste trabalho. A água resultante deste processo (AHD) foi filtrada sob vácuo, concentrada em evaporador rotativo a pressão reduzida, congelada e liofilizada.



Figura 11: Evaporador rotativo, a pressão reduzida: concentração da AHD obtida após hidrodestilação da planta

A caracterização fitoquímica da AHD foi obtida por cromatografia de camada fina (TLC) e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de fotodíodos (HPLC-PDA).

2.2.3.1 Cromatografia em camada fina (TLC)

A TLC é um processo de separação cromatográfico que consiste na aplicação da fase estacionária, na forma de uma camada fina, sobre um suporte sólido (Waksmundzka-Hajnos, Sherma e Kowalska, 2008). Devido à ação da capilaridade, ocorre a eluição da fase móvel, que arrasta consigo os compostos para os quais tem mais afinidade. Cada composto vai interagir de forma particular com a fase estacionária e a fase móvel e, assim, adquirir uma identidade única (Vermerris e Nicholson, 2006).

A mobilidade de um composto num determinado eluente é traduzida pelo fator de retenção, R_f , definido como o quociente entre a distância percorrida por um dado composto e a distância percorrida pelo solvente (Hahn-Deinstrop, 2006). A identificação de compostos

fenólicos através da TLC reside na possibilidade de relacionar o valor de R_f de uma substância num determinado eluente, com a sua estrutura. A aplicação de agentes químicos de revelação também contribui para esta possibilidade de identificação de compostos.

Nesta perspetiva, usou-se a TLC para a pesquisa de fitoquímicos na AHD, utilizando como fase estacionária placas pré-revestidas de sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck) e como fase móvel uma solução de acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial-água, num gradiente de 100:11:11:26 em volume. Optou-se por esta fase estacionária devido às suas características polares, ideais para a separação de polifenóis, uma vez que estes apresentam características de polaridade similares. Também a fase móvel foi constituída por solventes polares, de modo a ser evitada a fixação dos compostos à fase estacionária. Tendo em conta que ambas as fases são hidrofílicas, todos os compostos sofrem um arrastamento pela fase móvel, deslocando-se mais os compostos menos polares (Waksmundzka-Hajnos, Sherma e Kowalska, 2008). A eluição ocorreu numa câmara previamente saturada com a solução de solventes. Todas as TLC realizadas neste trabalho foram feitas nas mesmas condições.

Após a eliminação da fase móvel e tendo as placas sido observadas à luz visível e UV (366 nm), foram aplicados dois reveladores: NP-PEG e 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH). A aplicação de determinados reveladores permitir localizar na TLC manchas que contêm o mesmo tipo de compostos.

2.2.3.1.2 Reveladores

- NP-PEG

Este revelador é constituído pelo reagente NP, uma solução metanólica do éster aminoetílico do ácido difenilbórico a 1%, e pelo reagente PEG, uma solução etanólica de polietilenoglicol 4000 a 5%.

A aplicação de NP-PEG nas placas de TLC ocorre sequencialmente. Após evaporação, as placas são observadas à luz visível e ao UV (366 nm).

O reagente NP é descrito como um bom revelador de flavonóides em TLC, tendo a capacidade de reagir formando complexos fluorescentes que coram as manchas da TLC de cores diferentes, de acordo com as características estruturais dos compostos. O PEG é geralmente usado como intensificador de fluorescência. Este revelador permite detetar flavonóides e ácidos fenólicos, dando-nos algumas informações estruturais graças às cores exibidas pelas manchas ao UV, por exemplo azul para ácidos fenólicos e amarelo e laranja para flavonóides.

- DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)

O DPPH é um radical estável e utilizado com frequência para a detecção de substâncias com propriedades antioxidantes, uma vez que tem a capacidade de captar um eletrão. A preparação da solução de DPPH envolve a pesagem de 2 mg de DPPH para um balão de 20 mL e posterior aferição com metanol. De acordo com a técnica de análise bioautográfica, o cromatograma obtido na TLC é pulverizado com a solução de DPPH. A placa é observada 30 minutos após a pulverização, à luz visível. Este revelador permite detetar compostos com atividade antioxidante pelo aparecimento de manchas amarelas sob fundo rosa.

2.2.3.2 TLC preparativa

Para recuperar os compostos presentes nas manchas separadas por TLC, de forma a permitir a sua identificação por HPLC-PDA, realizou-se uma TLC preparativa. Esta técnica permitiu confirmar a que compostos correspondem as manchas obtidas na TLC. Após a análise por TLC e a observação das placas a 366 nm, detetaram-se 9 manchas, que foram delimitadas e recortadas. Os compostos foram solubilizados novamente, em água, tendo sido obtidas 9 amostras, cuja composição química foi posteriormente monitorizada por HPLC-PDA, a fim de confirmar a identificação de compostos.

2.2.3.3 Cromatografia Líquida de Alta Resolução com detetor de fotodíodos (HPLC-PDA)

A HPLC é uma cromatografia em coluna, em que a fase estacionária é um sólido polar, geralmente sílica ou alumina, e a fase móvel é líquida. A escolha dos solventes e o seu gradiente vão variar consoante a natureza da fase estacionária e os compostos a analisar.

Para este trabalho, utilizou-se HPLC para a separação dos compostos, acoplada a um detetor de fotodíodos (PDA), que permite a análise de cada um dos compostos, de forma a obter o respetivo espectro UV/Visível.

A análise por HPLC-PDA foi realizada num cromatógrafo líquido de alta resolução (HPLC) Gilson, equipado com duas bombas (modelo 305 e 306), misturador (modelo 811B), módulo manométrico (modelo 805) e um injetor automático (Gilson 234 Autoinjeter). O cromatógrafo é acoplado a um detetor de fotodíodos (Gilson, modelo 170) e a uma estação de controlo e tratamento de dados Unipoint System (Unipoint® 2.10).

Para a realização desta análise, os solventes foram microfiltrados, com filtros NL16 (0.2 µm; 50 µm) (Schleicher & Schuell, Germany) e desgaseificados num aparelho de ultrassons Branson (modelo B-2200 E1).

A fase estacionária usada foi uma coluna analítica de sílica, de fase reversa, RP18 Spherisorb Waters® ODS-2 com partículas de 5 µm (4.6 x 250 mm), mantida a 23-24°C e protegida por uma pré-coluna KS 30/4 Nucleosil 120-5, C-18, Macherey-Nagel (Düren, Germany). A fase móvel utilizada foi uma solução de água e metanol, usada em gradiente descontínuo (de 5% de metanol a 80% de metanol) a um fluxo de 1 mL/min. Optou-se pela eluição em gradiente, em detrimento da eluição isocrática, por forma a diminuir o tempo de análise e aumentar a eficácia da separação cromatográfica.

A amostra foi solubilizada em água, o volume injetado foi de 100 µL e os perfis cromatográficos foram registados a 280 e 320 nm. Foram também injetados padrões, de forma a permitir uma comparação de tempos de retenção, facilitando assim a identificação dos compostos da AHD.

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Óleo essencial

O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação com um rendimento de 0.31 % (v/m). O óleo, caracterizado por GC e GC-MS, é maioritariamente rico em hidrocarbonetos monoterpénicos, sendo os compostos maioritários o γ -terpineno (33.6%) e o sabineno (32.0%). Outro importante constituinte deste óleo essencial é o timol metil éter (15.7%). Para além destes compostos muitos outros monoterpénos (hidrocarbonetos e oxigenados) foram identificados mas em concentrações inferiores a 5%. No que respeita a fenilpropanóides apenas foi detetada a presença de dilapiol em quantidades vestigiais.

Atendendo à variabilidade química já anteriormente referida para o óleo essencial deste taxon, inclusivamente em Portugal, o OE de *C. maritimum* espontâneo da Nazaré pode inserir-se no quimiotipo 2 descrito por Pateira *et al.* (1999), ou seja, com teores de dilapiol inferiores a 6%.

2.3.2 Água de Hidrodestilação (AHD)

A AHD foi obtida com um rendimento de 10.34% e caracterizada quimicamente, recorrendo a técnicas cromatográficas, como HPLC-PDA e TLC. A identificação foi realizada por recurso à análise TLC com reveladores específicos, aos espectros UV por HPLC-PDA e também pelos tempos de retenção de alguns padrões comerciais de compostos fenólicos.

2.3.2.1 Análise da AHD por TLC

O perfil cromatográfico da AHD em TLC apresentado na Figura 12, por observação à luz UV (366 nm), após revelação com o reagente NP-PEG, permite verificar a presença de manchas de cores distintas, que indiciam a presença de compostos diferentes. Na Tabela 4 são apresentados os R_f correspondentes aos compostos detetados.

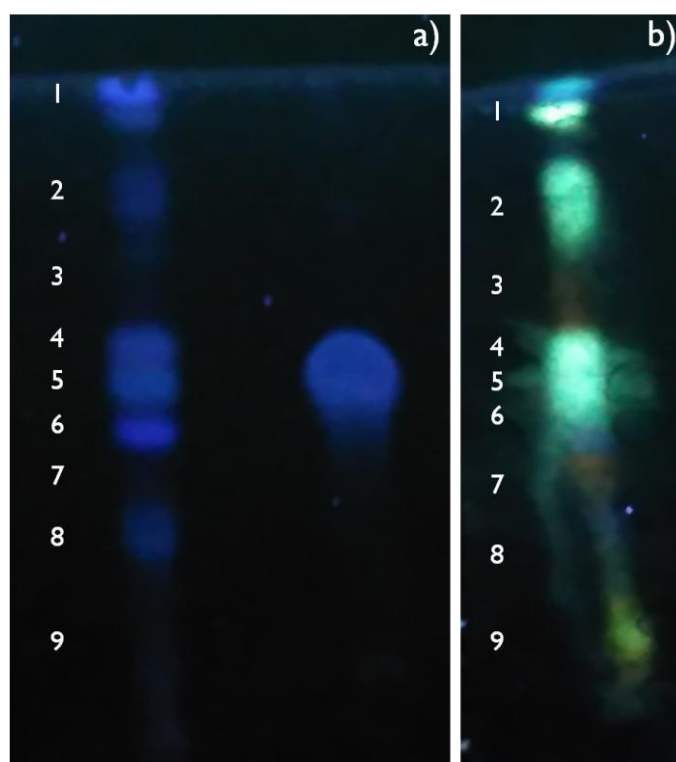


Figura 12: Perfil TLC da AHD por observação a 366 nm sem revelação com NP-PEG (a) e após revelação com NP-PEG (b). Na imagem a), à direita, surge o perfil TLC do padrão ácido clorogénico.

Tabela 4: Fator de retenção (Rf) das várias manchas observadas na TLC da AHD

Mancha	Fator de Retenção (Rf)
1	0.976
2	0.800
3	0.741
4	0.600
5	0.541
6	0.482
7	0.447
8	0.329
9	0.109

As manchas que, por observação com luz UV (366 nm), apresentam fluorescência azul, e cuja fluorescência aumenta de intensidade aquando da aplicação do reagente NP-PEG, referem-se a ácidos fenólicos e estão representados na Figura 12 pelos números 1,2,4,5,6 e 8. A mancha 4 pode corresponder ao ácido clorogénico uma vez que coincide com o padrão.

A mancha que apresenta a cor amarela esverdeada após a revelação com NP-PEG (a) e que não surge em b), pode ser um flavonol e está representada na Figura pelo número 9 e tem um Rf de 0.109. Tendo em conta que migra pouco, sendo por isso muito polar, pode provavelmente ser um glicósido.

Relativamente às manchas que surgem com a cor laranja em a) e não surgem em b), poderão ser flavonas e estão representadas na Figura pelos números 3 e 7. O facto de serem polares, poderá sugerir que estejam glicosiladas.

2.3.2.2 *Análise da AHD por HPLC/DAD e TLC preparativa*

A cromatografia líquida de alta resolução com deteção de díodos, HPLC-PDA, permitiu a obtenção dos cromatogramas apresentados nas Figura 13 e 15, e também a obtenção dos espetros apresentados na Figura 14. A sua análise permitiu uma tentativa de identificação dos compostos fenólicos presentes na AHD.

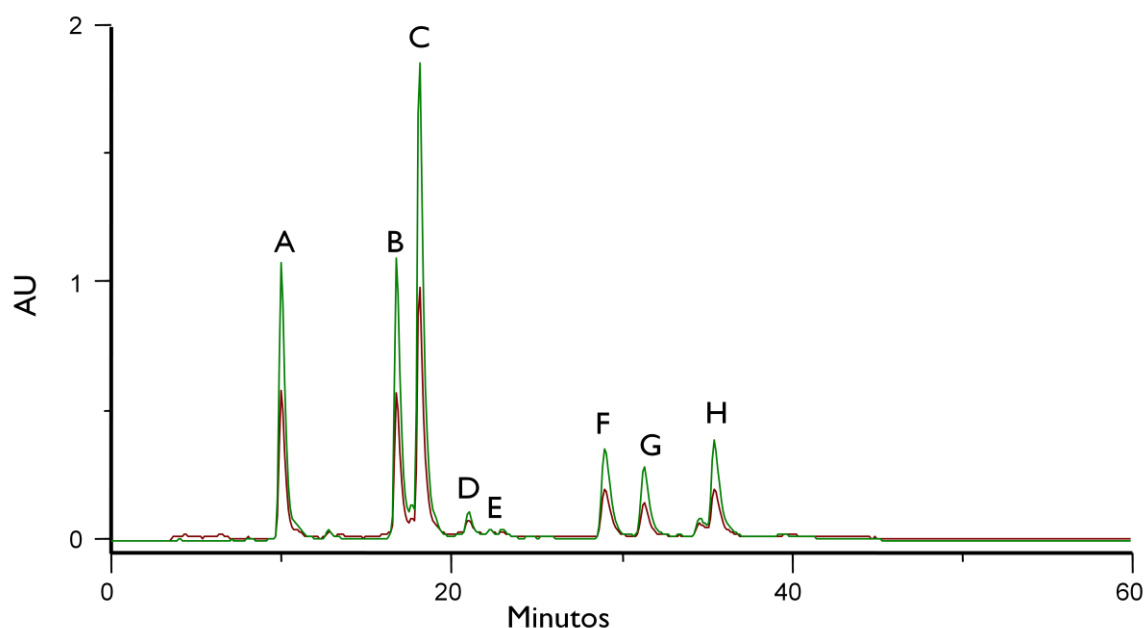


Figura 13: Perfil cromatográfico HPLC/DAD da AHD de *C. maritimum*, registrado a 280 nm (verde) e a 320 nm (vermelho).

Tabela 5: Tentativa de identificação das classes de compostos presentes na AHD de *C. maritimum*, considerando o tempo de retenção e o $\lambda_{\text{máximo}}$

Pico	$t_{\text{retenção}}$ (min)	$\lambda_{\text{máximo}}$	Identificação da classe do composto
A	10.04	246, 297sh, 324	Derivado do ácido cafeico ou ferúlico
B	16.71	250, 295sh, 325	Derivado do ácido cafeico ou ferúlico
C	18.10	247, 300sh, 325	Derivado do ácido cafeico ou ferúlico
D	21.00	245, 288sh, 312	Ácido p -cumárico
E	22.25	270, 330	Flavona (derivada da apigenina)
F	29.02	251, 268sh, 326	Derivado do ácido cafeico ou ferúlico
G	34.57	257, 299sh, 352	Flavonol (quercetina 3-O-glicosilada)
H	35.40	251, 299sh, 329	Derivado do ácido cafeico ou ferúlico

Os compostos fenólicos, dependendo da sua estrutura em termos de hidroxilos fenólicos e do número de ligações duplas conjugadas, vão absorver a comprimentos de onda diferentes e característicos para cada classe de compostos.

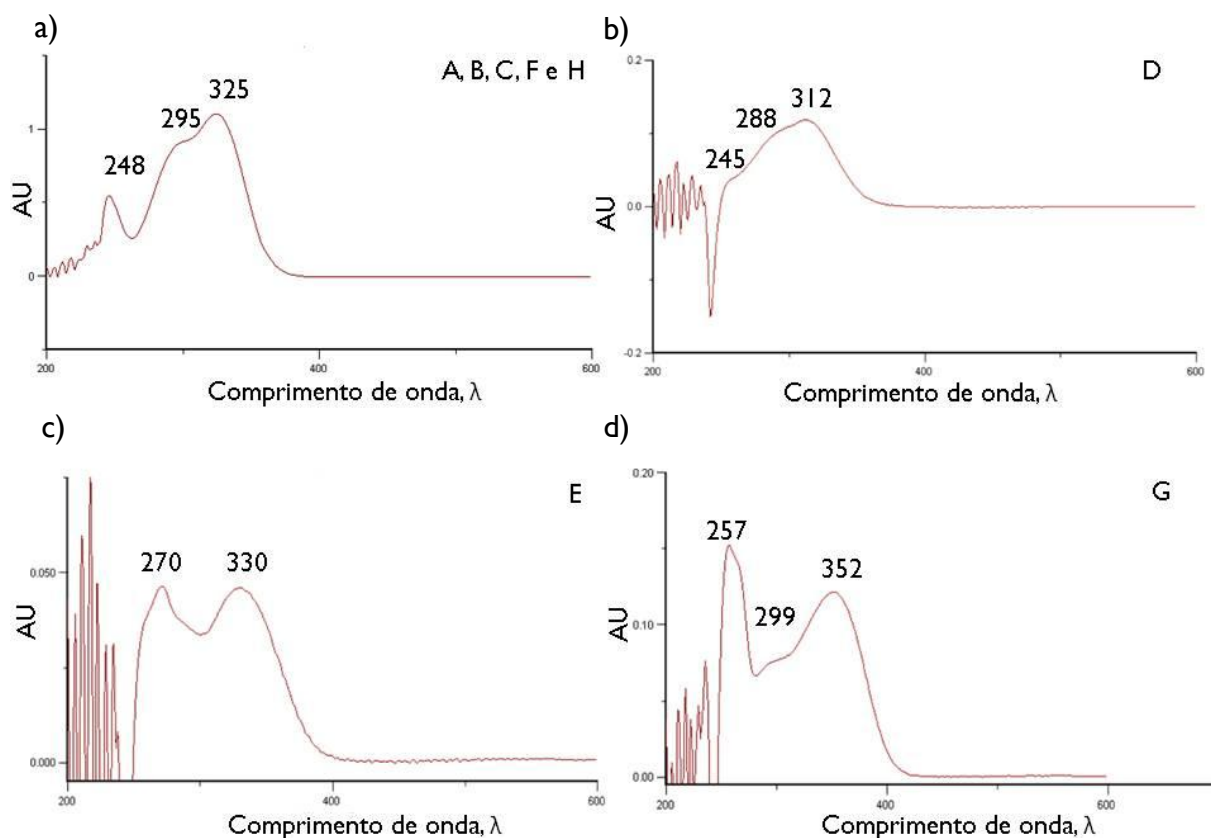


Figura 14: Espectros UV dos compostos fenólicos presentes na AHD de *C. maritimum*, obtidos *on line* por HPLC/DAD.

Pela análise do seu espectro, os picos A, B, C, F e H (Figura 14a) correspondem a ácidos fenólicos, derivados do cafeico ou ferúlico, pelo formato caraterístico que apresentam e pelos comprimentos de onda dos máximos que exibem. O facto de eluírem em tempos de retenção baixos permite concluir que estes compostos são ácidos fenólicos combinados e não ácidos fenólicos simples, o que os torna mais polares e faz com que eluam mais cedo.

Pelo facto de o tempo de retenção do pico C ter coincidido com o tempo de retenção do padrão (Tabela 6), sugere-se que seja ácido clorogénico. Pela TLC preparativa (Figura 15), foi possível associar as manchas obtidas por TLC com os picos do cromatograma HPLC-PDA. Assim, o pico C da HPLC corresponde à mancha 4 da TLC que tinha anteriormente sido identificado como o ácido clorogénico.

Tabela 6: Tempos de retenção obtidos para os padrões de ácidos fenólicos analisados

Padrão	$t_{\text{retenção}}$ (min)
Ácido clorogénico	17.00
Ácido gálico	20.50
Ácido p -cumárico	21.05
Ácido ferúlico	22.70
Ácido rosmarínico	29.30

Relativamente ao pico D, apresenta um espectro característico de um ácido cumárico (b) e o seu tempo de retenção coincide com o tempo de retenção do padrão, pelo que se sugere que seja um ácido p -cumárico. Na TLC preparativa (Figura 15), o pico D corresponde à mancha I da TLC e o espectro é o característico de um ácido p -cumárico.

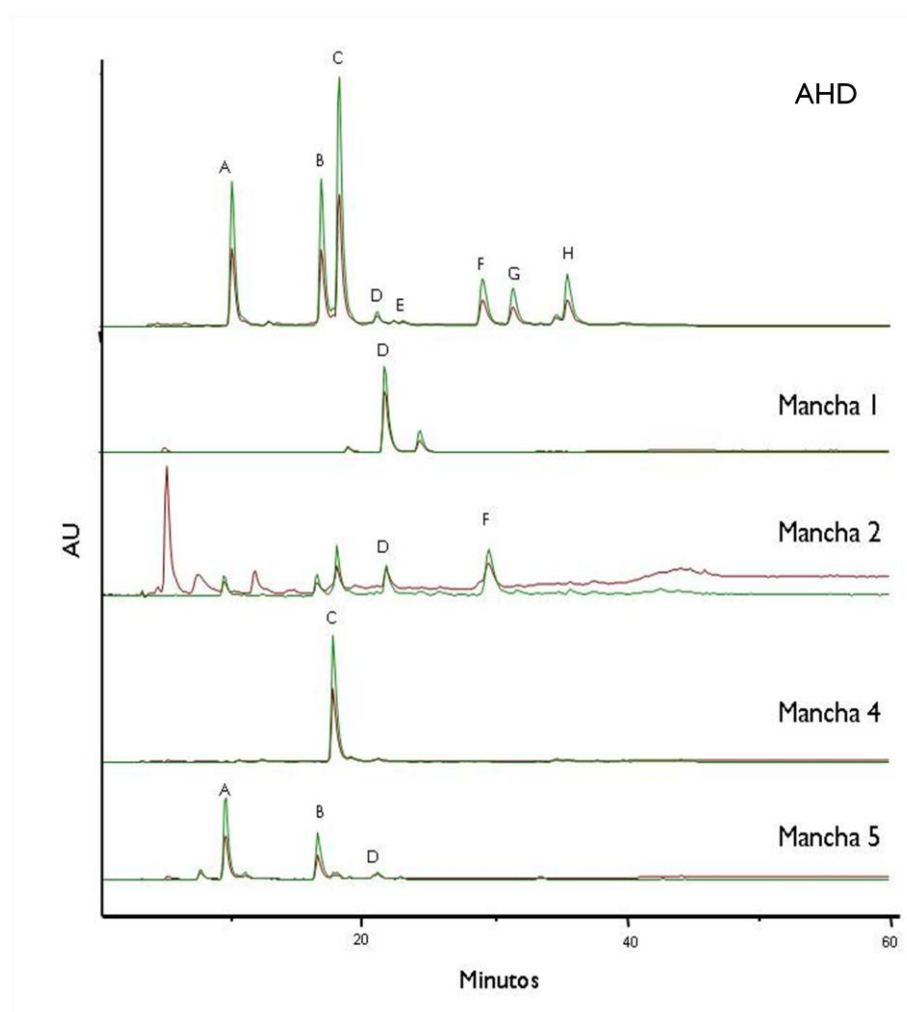


Figura 15: Perfil HPLC-PDA das amostras obtidas após a TLC preparativa, registado a 280 nm (verde) e a 320 nm (vermelho).

A análise do espectro c) da figura 14 permite inferir que o composto fenólico detetado tem a banda I a 330 nm, o que sugere que seja uma flavona com um hidroxilo livre no anel B, porque se tivesse dois hidroxilos livres no anel B a banda I estaria a 350 nm. A banda II tem o máximo a 270 nm, o que indica que tem dois hidroxilos livres no anel A. O facto de não haver desdobramento da banda II é outro dado que indica que só há um hidroxilo livre no anel B. O facto de apresentar um tempo de retenção baixo permite sugerir que seja um glicósido porque aumenta a polaridade do composto. Sugere-se então que o composto E seja um derivado da apigenina.

Pela análise do espectro d) da figura 14 pode observar-se que a banda I é inferior à banda II, o que sugere a presença de um flavonol com glicosilação no hidroxilo do carbono 3. A banda II apresenta desdobramento, o que revela que há mais do que um hidroxilo no anel B. Relativamente ao anel A, o facto de a banda II estar a 257 nm indicia a presença de dois hidroxilos. A presença de uma inflexão sugere que a posição 7 esteja livre. Pode propor-se então que o composto G seja uma quercetina glicosilada na posição 3.

A injeção dos padrões apresentada na tabela 6 permite concluir que os ácidos gálgico, ferúlico livre e rosmarínico não estão presentes na amostra de AHD analisada neste trabalho.

Relativamente à TLC preparativa (figura 15), todas as manchas (1 a 9) foram controladas por HPLC-PDA. No entanto, nas manchas 3, 6, 7, 8 e 9 não foram detetados compostos, pelo que não são apresentadas neste trabalho.

3. ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

3.1 Introdução

Os fungos, inclusivamente os de origem alimentar, representam um sério risco para a população mundial, tendo em conta que são agente etiológico de várias infeções patogénicas graves, cuja prevalência tem aumentado ao longo das últimas décadas (Pfaller, Pappas e Wingard, 2006). Com um foco particular em indivíduos imunocomprometidos, este problema tem sido intensificado por uma maior prevalência de doenças infecciosas (Nikaido, 2009).

A incidência e a gravidade das infeções fúngicas estão dependentes da virulência da estirpe, do estado imunológico do hospedeiro, do local onde ocorre a infeção e de fatores ambientais que podem acelerar ou atrasar o processo infeccioso (Weitzman e Summerbell, 1995).

As infeções fúngicas podem classificar-se como superficiais, quando são confinadas às camadas externas do epitélio, ou invasivas, quando o agente patogénico tem a capacidade de ultrapassar esta barreira e disseminar-se sistemicamente, podendo causar infeções metastáticas como a endocardite, osteomielite e meningite (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2013).

As infeções fúngicas superficiais são um problema global comum, que afetam maioritariamente a pele e as unhas e têm uma prevalência elevada. Cerca de 20 a 25% da população mundial relata a ocorrência de micoses na pele, fazendo com que esta seja uma das formas mais frequentes de infeção (Havlickova, Czaika e Fredrich, 2008). Os principais agentes etiológicos responsáveis por estas infeções fúngicas superficiais são distribuídos pelos géneros *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton* (Havlickova, Czaika e Fredrich, 2008).

Embora as infeções fúngicas superficiais sejam as mais comuns, nos últimos anos tem vindo a ocorrer um aumento significativo da incidência e severidade das infeções fúngicas invasivas. Algumas destas infeções, bem como as suas taxas de mortalidade, que relevam a importância do seu estudo, podem observar-se na Tabela 7. A maioria dos casos é de etiologia atribuída a fungos oportunistas dos géneros *Candida* e *Aspergillus* e afetam essencialmente indivíduos imunocomprometidos, que existem em número cada vez mais elevado, nomeadamente em países desenvolvidos (Lass-Flörl, 2009).

Tabela 7: Infecções fúngicas e espécies que as originam, respetiva localização e taxas de mortalidade, adaptado de Brown *et al.* (2012)

Infecções fúngicas (espécie mais comum)	Localização	Taxas de mortalidade (% em populações infetadas)
Micoses oportunistas invasivas		
Aspergilose (<i>Aspergillus fumigatus</i>)	Todo o mundo	30-95
Candidíase (<i>Candida albicans</i>)	Todo o mundo	46-75
Criptococose (<i>Cryptococcus neoformans</i>)	Todo o mundo	20-70

Estas infecções podem ser tratadas com uma gama ampla de antifúngicos comercialmente disponíveis. No entanto, o aumento da resistência de várias estirpes aos antifúngicos e os possíveis efeitos secundários associados, como hepatotoxicidade, neurotoxicidade e nefrotoxicidade, fazem com que o tratamento seja muitas vezes mal sucedido (Gupta e Cooper, 2008), o que releva cada vez mais o investimento científico nesta área.

Enquanto que a *Candida albicans* é o principal agente responsável por doenças da mucosa, o *Aspergillus fumigatus* é o responsável pela maioria das doenças alérgicas de origem fúngica e o *Trichophyton* spp., especialmente o *T. rubrum*, é o agente etiológico da grande maioria das infecções cutâneas (Bongomin *et al.*, 2017).

As infecções fúngicas mais comuns e mais severas, nomeadamente em indivíduos imunocomprometidos, são as candidíases, as criptococoses, as dermatofitoses e as aspergiloses. Apresenta-se de seguida, e de forma mais pormenorizada, cada uma destas infecções, referindo os agentes etiológicos, sintomas e tratamentos associados.

3.1.1 Candidíases

A candidíase é uma patologia de origem fúngica caracterizada pela infeção do hospedeiro por leveduras do género *Candida*. Estas espécies são microrganismos comensais da cavidade oral, trato gastrintestinal e vagina (Mardh *et al.*, 2002).

As infecções causadas por *Candida* spp. constituem a causa mais frequente de infecções fúngicas invasivas em todo o mundo, sendo que as principais estirpes referidas são, por ordem de frequência, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. guilliermondii* (Pfaller e Diekema, 2010). A candidíase vulvovaginal é uma das candidíases

superficiais mais comuns, que afeta 70 a 75% das mulheres pelo menos uma vez durante a vida, sendo que 40 a 45% irão sofrer de infecção recorrente (Palmeira-de-Oliveira *et al.*, 2009).

Relativamente à terapia, dos antifúngicos disponíveis no mercado, só alguns demonstram ter efeito em infecções de *Candida spp.*, como a anfotericina B, o fluconazol e o itraconazol (Carrillo-Munoz *et al.*, 2006). A anfotericina B foi o principal antifúngico usado no tratamento de candidíases sistêmicas durante muito tempo, mas a toxicidade elevada fez com que fosse parcialmente substituída pelo fluconazol que, embora também tenha um elevado espectro de ação, é menos tóxico (Ruhnke, 2008). O problema do uso intensivo deste fármaco e de outros derivados azólicos, em tratamento ou profilaxia de candidíases, nomeadamente em população de risco, é que conduziu ao desenvolvimento de resistências e suscetibilidade reduzida a estes compostos (Pfaller e Diekema, 2010; Binder e Lass-Flörl, 2011).

A resistência da *C. albicans* ao fluconazol estima-se que seja de 0 a 5%, sendo que a taxa mais elevada foi reportada na África do Sul. A resistência a este fármaco é um problema com proporções muito maiores entre as espécies não *albicans* e varia entre 5 a 65%, sendo que a taxa mais elevada foi reportada na Dinamarca. Esta resistência é problemática porque, em muitas partes do mundo, o fluconazol é o único fármaco antifúngico disponível para o tratamento de infecções com *Candida* (Vallabhaneni *et al.*, 2016).

Os mecanismos de patogenicidade associados às infecções por *Candida spp.* ainda não estão completamente estabelecidos, mas pensa-se que estejam associados à formação de tubo germinativo e à organização da levedura em biofilmes. Os biofilmes promovem a expressão de genes de resistência o que resulta em modificações fenotípicas das células da levedura. Além disso, a formação de biofilmes protege a levedura da resposta imunológica do hospedeiro (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2013; Palmeira-de-Oliveira *et al.*, 2009).

Por outro lado, a capacidade da levedura para transitar para formas filamentosas pela formação de um tubo germinativo é considerado o fator de maior relevância para a invasão dos tecidos, além de permitir que haja uma resistência aumentada à fagocitose. A formação do tubo germinativo é um fator de virulência relevante, nomeadamente nas infecções por *C. albicans* (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2013).

Consequentemente, a inibição do tubo germinativo e a disrupção da organização dos biofilmes podem ser alvos promissores para um controlo destas infecções, evitando a disseminação do agente infeccioso.

3.1.2 Criptococoses

A criptococose tem como agente etiológico o *Cryptococcus neoformans*, comumente presente em excrementos de aves (principalmente pombos cosmopolitas). Os esporos infecciosos de *C. neoformans* são inalados e a patologia desenvolve-se inicialmente no trato pulmonar (Kwon-chung *et al.*, 2016; Poeta, Del e Casadevall, 2012). Em indivíduos imunocomprometidos, esta patologia pode chegar ao cérebro, resultando em danos neurológicos, como a meningoencefalite (Desalermos, Kourkoumpetis e Mylonakis, 2012).

Em termos de terapêutica, utiliza-se uma terapia combinada com anfotericina B e flucitosina e manutenção com fluconazol, embora as taxas de sucesso sejam de apenas 50 a 80% (Binder e Lass-Flörl, 2011; Bratton *et al.*, 2012).

3.1.3 Aspergiloses

As patologias pulmonares com infecção tecidual provocada por *Aspergillus spp.* são as aspergiloses, sendo que a principal via de infecção é a inalação de esporos (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2013).

Entre as espécies mais frequentes de *Aspergillus spp.*, está o *A. fumigatus*, responsável por cerca de 90% das infecções, seguido de *A. flavus*, *A. terreus* e *A. niger* (Hadrich *et al.*, 2012).

Nos últimos anos verificou-se epidemiologicamente um aumento da incidência de aspergiloses invasivas relativamente a candidíases invasivas em algumas populações na Europa (Lass-Flörl, 2009), o que pode ser preocupante porque, sem tratamento, a taxa de mortalidade associada à aspergilose pode atingir os 95% (Brown *et al.*, 2012).

Relativamente à terapêutica, os antifúngicos mais usados no tratamento e profilaxia das aspergiloses são os derivados azólicos, tais como voriconazol, itraconazol, e posaconazol (Pfaller *et al.*, 2011). Um dos grandes problemas dos *Aspergillus spp.* é o facto de produzirem aflatoxinas, que são muitas vezes responsáveis pela contaminação de alimentos, nomeadamente se produzidos e/ou armazenados em zonas de temperatura e humidade elevada. Este fator tem um impacto elevado em termos de segurança alimentar, rendimento agrícola e pecuário (Zuzarte *et al.*, 2014).

3.1.4 Dermatofitoses

Estamos na presença de uma dermatofitose quando ocorre uma infecção causada por fungos dermatófitos que, ao produzirem queratinases e outras enzimas queratolíticas, vão degradar tecido queratinoso e gerar infecções na pele, unhas e cabelo (Weitzman e Summerbell, 1995; Zuzarte *et al.*, 2011). Embora sejam infecções superficiais não invasivas e geralmente pouco severas, podem progredir para infecções invasivas em indivíduos imunocomprometidos, podendo alastrar a camadas mais profundas da pele e outros órgãos. Além disso, estas lesões mais graves podem funcionar como ponto de entrada para outros organismos patogênicos e, assim, dar origem a infecções potencialmente fatais (Venturini *et al.*, 2012).

As patologias com origem em dermatófitos que ocorrem com maior frequência são a onicomicose (tinea unguium) e o pé-de-atleta (tinea pedis), associadas principalmente a *T. rubrum*, *T. mentagrophytes var interdigitale*, *E. floccosum*, *M. gypseum* e *T. verrucosum* (Havlickova, Czaika e Fredrich, 2008).

Os fármacos prescritos para dermatofitoses incluem formulações tópicas e orais, de fármacos antifúngicos da classe dos azóis, como o clotrimazol e o miconazol, e das alilaminas, como a terbinafina e a naftifina (Gupta e Cooper, 2008).

3.2 Material e métodos

3.2.1 Estirpes fúngicas

A atividade antifúngica do óleo essencial e da AHD foi testada em leveduras e fungos filamentosos. As tabelas seguintes sintetizam as estirpes utilizadas, tendo em conta a sua origem e referência, para as estirpes de referência (tabela 8), e a origem clínica e respetiva referência para as estirpes clínicas (tabela 9).

Tabela 8: Estirpes de Referência, respetiva origem e referência

Levedura/Fungo filamentoso	Origem	Referência
<i>Candida albicans</i>	American Type Culture Collection	ATCC 10231
<i>Candida tropicalis</i>	American Type Culture Collection	ATCC 13803
<i>Candida parapsilosis</i>	American Type Culture Collection	ATCC 90018
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Colección Española de Culturas Tipo	CECT 1078
<i>Trichophyton rubrum</i>	Colección Española de Culturas Tipo	CECT 2794
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i>	Colección Española de Culturas Tipo	CECT 2958
<i>Trichophyton verrucosum</i>	Colección Española de Culturas Tipo	CECT 2992
<i>Microsporum gypseum</i>	Colección Española de Culturas Tipo	CECT 2908
<i>Aspergillus niger</i>	American Type Culture Collection	ATCC 16404
<i>Aspergillus fumigatus</i>	American Type Culture Collection	ATCC 46645

Tabela 9: Estirpes isoladas clinicamente, respetiva origem e referência

Levedura/Fungo filamentoso	Origem	Referência
<i>Candida krusei</i>	Candidíase vulvovaginal	H9
<i>Candida guilliermondii</i>	Candidíase vulvovaginal	MAT23
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Pele e unhas	FF7
<i>Microsporum canis</i>	Pele e unhas	FF1
<i>Epidermophyton floccosum</i>	Pele e unhas	FF9
<i>Aspergillus flavus</i>	Secreções brônquicas	F44

A subcultura das estirpes foi feita em SDA - Oxoid, Hampshire, Inglaterra (Sabouraud Dextrose Agar) ou PDA - Oxoid, Hampshire, Inglaterra (Potato Dextrose Agar, para assegurar a sua pureza e viabilidade.

3.2.2 Avaliação da atividade antifúngica

Para determinar a Concentração Mínima Inibitória (MIC) e a Concentração Mínima Letal (MLC) do óleo essencial e da AHD foi utilizado o método de macrodiluição, descrito em protocolos do Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI), com a referência M27-A3 para leveduras (CLSI, 2008) e M38-A2 para fungos filamentosos (CLSI, 2008). Foi selecionado o método de macrodiluição por permitir a utilização de tubos de ensaio de vidro, eliminando assim a possibilidade de ocorrência de quaisquer interações entre as amostras e o plástico que compõe as placas de multiposos usadas para a realização do método de microdiluição.

Para os ensaios de avaliação da atividade antifúngica, utilizou-se o meio líquido RPMI 1640 (BioChrom Ag., Berlim, Alemanha) sem bicarbonato, com L-glutamina, tamponizado com MOPS [ácido 3-(N-morfolino)-propanossufónico] e ajustado a pH 7.0. Este meio foi também usado para preparação das diluições de extrato. Para preparar as diluições de óleo essencial, utilizou-se dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich, MO, USA). A concentração final de DMSO nunca excedeu 1% (v/v).

O desenho experimental do ensaio teve por base uma série de tubos de vidro estéreis, em duplicado para cada uma das condições a testar. Para cada estirpe é considerado um controlo negativo, com RPMI, funcionando como controlo de esterilidade do meio, um controlo positivo, com DMSO e RPMI inoculado, que é um controlo de crescimento e viabilidade do fungo filamentosos/levedura, e as diversas diluições de óleo essencial ou AHD a analisar, num intervalo de concentrações previamente definido.

Para preparar os inóculos dos fungos filamentosos, procedeu-se a agitação em vórtex com pérolas de vidro estéreis para a recolha dos esporos e a densidade da suspensão foi ajustada visualmente de acordo com o tubo I da escala de McFarland, de modo a obter uma concentração final no tubo de ensaio de $(1-2) \times 10^4$ células/mL. No caso dos esporos de *Aspergillus* spp. e devido à sua hidrofobicidade, foi adicionada uma gota de Tween 20 estéril, permitindo assim a suspensão.

A preparação dos inóculos de leveduras envolveu a seleção das colónias mais recentes e o ajuste da densidade das suspensões celulares visualmente, de acordo com o

tubo 0.5 da escala de McFarland. Foi ainda confirmada espectrofotometricamente, por um valor de absorvância de 0.18, de modo a obter uma concentração final no tubo de ensaio de $(1-2) \times 10^3$ células/mL.

Os tubos de ensaio foram incubados aerobiamente, a 35°C por um período de 48 horas para as estirpes de *Candida* spp. e *Aspergillus* spp. e por 72 horas para o *Cryptococcus neoformans*. Relativamente às estirpes de dermatófitos, foram incubadas aerobiamente durante 7 dias, a 30 °C. Após os tempos de incubação, os valores de MIC foram registados, tendo em conta a observação verificação visual de crescimento ou não crescimento em comparação com os controlos negativo e positivo.

Para avaliar as MLC, após as leituras das MIC foram retirados 20 µL de cada tubo negativo e inoculados em caixas de petri com SDA, nas mesmas condições de tempo e temperatura descritas anteriormente. Os resultados foram lidos por confirmação visual de crescimento ou não crescimento do fungo/levedura, correspondendo o valor de MLC à concentração mínima de composto que é letal para a estirpe fúngica em questão.

Os valores obtidos para a avaliação da atividade antifúngica, MIC e MLC, são expressos em µL/mL, correspondendo a três ensaios independentes.

3.2.3 Mecanismo de ação

A *Candida albicans* é um dos principais agentes causadores de infeção fúngica invasiva, pelo que a investigação do seu mecanismo de ação, nomeadamente em fatores de virulência, tais como a inibição do tubo germinativo e a formação de biofilmes, é muito relevante. Saville *et al.* (2006) afirmam que a filamentação é importante na progressão da *C. albicans* para doença ativa.

Por outro lado, vários estudos (Uppuluri, Pierce e López-Ribot, 2009; Nobile e Johnson, 2015; Gulati e Nobile, 2016) salientam o facto de o impacto infeccioso de *C. albicans* depender da sua capacidade para se desenvolver formando um biofilme, que consiste numa porção de células aderente e compacta da levedura. Estes biofilmes são resistentes à terapêutica antifúngica convencional, ao sistema imunológico do hospedeiro e a perturbações ambientais, pelo que constituem um desafio clínico significativo.

Tudo isto releva o facto de estudar estes fatores de virulência da *C. albicans*, de forma a inferir acerca da atividade do OE. O mesmo estudo não foi feito para a AHD porque não demonstrou ter atividade antifúngica até um valor de concentração de 5 mg/mL.

3.2.3.1 Inibição do tubo germinativo

A capacidade do óleo essencial em termos de inibição da formação do tubo germinativo em *Candida albicans* foi avaliada de acordo com o método descrito por Pinto et al., (2009).

Concentrações de óleo essencial diluído em DMSO, de 2,1 a 0.015 mg/mL, foram preparadas e foram adicionados, a tubos estéreis, 10 µL de cada diluição. Todas as concentrações foram testadas em duplicado e foi usado DMSO como controlo positivo. A concentração final de DMSO nunca excedeu 1% v/v.

Após incubação *overnight* em SDA a 35°C, foi feita uma suspensão de *C. albicans* em meio NYP [composto por *N-acetyl-D-glucosamine* (Sigma), 10⁻³M; *Yeast Nitrogen Base* (Difco), 3.35 g/L; *Proline*(Fluka), 10⁻³M; NaCl 4.5 g/L, com pH 6.7±0.1].

A densidade da suspensão em meio NYP foi ajustada visualmente à turvação do tubo 0.5 da escala de McFarland (1.5x10⁶ células/mL). Foram adicionados 990 µL de NYP inoculado aos tubos de ensaio e estes foram sujeitos a 3 horas de incubação a 37 °C.

Posteriormente, fez-se a leitura e foram contabilizadas 100 células numa câmara de Neubauer, sendo que se distinguiram as células filamentadas das células não filamentadas. As células filamentadas são caracterizadas por um filamento cilíndrico sem qualquer constrição na base, de tal modo que, todas as células que não possuam estas características são consideradas não filamentadas.

Os resultados são apresentados como média, de um mínimo de três ensaios independentes.

3.2.3.2 Avaliação do efeito do OE na formação de biofilmes de *C. albicans*

O efeito do óleo essencial na formação de biofilmes de *C. albicans* foi avaliado de acordo com o método descrito por Taweechaisupapong et al.(2012).

Um loop de células de *C. albicans* ATCC 10231, previamente em cultura em SDA durante 18-20 horas a 37 °C, foi suspenso em meio Yeast Peptone Dextrose (YPD, composto por 1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de dextrose) e incubado durante 24 horas a 37 °C. Após este período de tempo, o YPD foi removido e as células foram cuidadosamente lavadas, duas vezes, com PBS estéril (0.8% NaCl, 0.02% KH₂PO₄, 0.31% Na₂HPO₄.12H₂O, 0.02% KCl, a pH 7.4). Entre cada lavagem, centrifugou-se a suspensão de células por 5 minutos a 2000g. O aglomerado de células foi depois ressuspenso

em meio RPMI e a densidade de células foi ajustada a aproximadamente 1×10^6 células/mL, confirmando-se este valor por contagem em câmara de Neubauer.

Posteriormente, foram adicionados aos poços de uma placa de microtitulação 100 μ L desta suspensão de células e 100 μ L das diluições de óleo essencial em meio RPMI nas concentrações a testar, de 2,1 a 0,06 mg/mL. Foram, desta forma, preparadas duas placas, uma para avaliar o efeito após 24 horas da atividade do óleo essencial, que foi a incubar 24 horas a 37 °C, e uma para avaliar o seu efeito após 48 horas, que foi a incubar 48 horas a 37 °C. Após cada tempo de incubação, a viabilidade do biofilme foi avaliada pelo método de XTT e a biomassa foi avaliada pelo método de Cristal Violeta.

Para preparar o controlo negativo, foi adicionado aos poços selecionados meio RPMI estéril enquanto que o controlo positivo consistiu na adição de meio RPMI inoculado.

Todas as determinações foram feitas em duplicado relativamente a três ensaios independentes.

3.2.3.3 Avaliação do efeito do OE nos biofilmes pré-formados de *C. albicans*

Avaliou-se o efeito do óleo essencial de nos biofilmes pré-formados, por adaptação do método descrito por Taweekaisupapong *et al.*(2012).

Para tal, uma ansa de células da levedura, previamente em cultura em SDA durante 18-20 horas a 37 °C, foi suspenso em meio YPD e incubado durante 24 horas a 37 °C. Após este período de tempo, o YPD foi removido e as células foram cuidadosamente lavadas, duas vezes, com PBS estéril. Entre cada lavagem, centrifugou-se a suspensão de células por 5 minutos a 2000g. O aglomerado de células foi depois ressuspenso em meio RPMI e a densidade de células foi ajustada a aproximadamente 1×10^6 células/mL, confirmando-se este valor por contagem em câmara de Neubauer. Posteriormente, foram adicionados 200 μ L desta suspensão de células aos poços selecionados de uma placa de microtitulação e foi a incubar por um período de 24 horas a 37 °C.

Para preparar o controlo negativo, foi adicionado aos poços respetivos meio RPMI estéril enquanto que o controlo positivo consistiu na adição de meio RPMI inoculado. Após o período de incubação, são adicionadas aos poços as concentrações de óleo essencial a testar, de 2,1 a 0,06 μ L/mL, para avaliar a sua ação nos biofilmes pré-formados, e vai a incubar novamente por um período de 24 horas a 37 °C.

Todas as determinações foram feitas em duplicado relativamente a três ensaios independentes.

3.2.3.3.1 *Quantificação da biomassa pelo ensaio de cristal violeta*

O ensaio de cristal violeta para quantificação da massa do biofilme foi adaptado do método descrito por Raut *et al.* (2013). Este método foi utilizado, tanto para a quantificação da biomassa em biofilmes pré-formados, como para a quantificação da biomassa na formação de biofilmes.

Após todo o procedimento descrito em 3.2.3.2 e em 3.2.3.3, o meio foi removido e as células foram fixadas ao poço com metanol a 99%, por 15 minutos. O sobrenadante foi depois removido e deixaram-se secar os poços ao ar por 1-2 minutos. Adicionou-se posteriormente 100 µL de uma solução a 0.02% de Cristal Violeta (CV), que se manteve a corar as células por um período de tempo de 15 minutos. O CV em excesso foi removido por lavagem dos poços, 3 vezes, com água destilada esterilizada. Foram posteriormente adicionados 150 µL de ácido acético a 33%, com o objetivo de libertar das células o corante absorvido, e a mistura foi transferida para uma nova microplaca.

Com um leitor de placas de microtitulação, foi registada a densidade ótica (OD) a 620 nm. A biomassa foi determinada por comparação da OD de amostras tratadas com óleo essencial com a OD do controlo.

Os resultados obtidos foram realizados em duplicado e apresentados na forma de média \pm desvio padrão de três ensaios independentes.

3.2.3.3.2 *Avaliação da viabilidade pelo ensaio de metabolização de XTT*

O ensaio de viabilidade do biofilme por metabolização de XTT utilizado foi adaptado de Saharkhiz *et al.* (2012). Este ensaio foi utilizado para avaliação da viabilidade do biofilme, tanto no ensaio que avalia a destruição de biofilmes pré-formados como no que avalia a inibição da formação do biofilme. Após toda a execução do procedimento descrito em 3.2.3.2 e em 3.2.3.3, o meio foi removido e os poços foram cuidadosamente lavados com PBS estéril de pH 7.4. A uma solução de XTT de 1mg/mL, foi adicionada menadiona (10mM em acetona), de forma a perfazer uma concentração final de 4 µM. Adicionou-se 100 µL da solução de menadiona em XTT aos poços selecionados, posteriormente incubados por 2 horas a 37 °C e ao abrigo da luz.

A absorvância foi lida num leitor de placas de microtitulação, a 490 nm, e a viabilidade do biofilme foi determinada por comparação da absorvância das amostras tratadas com óleo essencial com as amostras controlo.

Os resultados foram apresentados na forma de média \pm desvio padrão, referente a três ensaios independentes, sendo que todos os ensaios foram realizados em duplicado.

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Avaliação da Atividade Antifúngica

Os resultados obtidos para a atividade antifúngica (MIC e MLC) do OE e da AHD de *C. maritimum* estão sumarizados na Tabela 10. Em relação ao potencial antifúngico do OE, de todas as estirpes fúngicas testadas, a que se revelou mais suscetível foi a de *Cryptococcus neoformans*, inibindo o seu crescimento (MIC) a uma concentração de 0.26 mg/mL e sendo letal (MLC) a uma concentração de 0.52 mg/mL. Para as estirpes de dermatófitos, os valores de MIC e MLC variaram entre 0.52 e 4.2 mg/mL. As estirpes que se revelaram mais sensíveis foram *Epidermophyton floccosum* e *Microsporum canis* (MIC e MLC com valor de 0.52 mg/mL).

Para as estirpes de *Candida*, os valores de MIC oscilaram entre 1.05 e 2.1 mg/mL e os valores de MLC entre 1.05 e >4.2 mg/mL, sendo que a estirpe mais suscetível foi *Candida guilliermondii* (MIC e MLC de 1.05 mg/mL). Relativamente às estirpes de *Aspergillus*, todas apresentaram valores de MIC de 8.4 mg/mL, e valores de MLC de >8.4 mg/mL.

Foram tidos em conta na análise da atividade antifúngica, os valores de MIC e MLC dos compostos maioritários do OE, sabineno e γ -terpineno, previamente estudados (Valente *et al.*, 2013; Vale-Silva *et al.*, 2012). Relativamente ao γ -terpineno, a estirpe para a qual é mais ativo é a de *Cryptococcus neoformans*, inibindo o crescimento do fungo a 0.52 mg/mL e sendo letal a uma concentração de 1.05 mg/mL. Pode ainda referir-se que para a maioria dos fungos filamentosos e leveduras testados, os valores de MIC e MLC foram superiores aos obtidos para o óleo, pelo que se conclui que o γ -terpineno tem uma menor atividade antifúngica que o óleo essencial.

A análise dos resultados obtidos para o sabineno permite inferir que a estirpe para a qual é mais ativo é a de *Trichophyton rubrum*, apresentando um MIC de 0.13 mg/mL e um MLC de 0.26 mg/mL. Relativamente ao OE, o sabineno apresentou valores de MIC e MLC inferiores aos do óleo essencial, sendo, portanto, mais ativo. Os resultados obtidos permitem sugerir que a atividade antifúngica do OE de *C. maritimum* poderá dever-se maioritariamente à presença de sabineno.

Relativamente à AHD, para todas as estirpes testadas, os valores de MIC e MLC são superiores a 5 mg/mL.

Tabela 10: Atividade antifúngica (MIC e MLC) da AHD, do óleo essencial de *C. maritimum* e dos seus compostos maioritários (γ -terpineno e sabineno) contra estirpes de *Candida*, *Cryptococcus neoformans*, dermatófitos e *Aspergillus*

Estirpes	<i>C. maritimum</i> O.E.		<i>C. maritimum</i> AHD		γ -Terpineno		Sabineno	
	MIC	MLC	MIC	MLC	MIC	MLC	MIC	MLC
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	2.1	4.2	>5	>5	2.1	4.2	0.52	0.52
<i>Candida guilliermondii</i> MAT23	1.05	1.05	>5	>5	1.05-2.1	2.1-4.2	0.52	0.52-1.05
<i>Candida krusei</i> H9	2.1	2.1	>5	>5	4.2	8.4	0.52	0.52
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 90018	1.05	>4.2	>5	>5	4.2	16.8	1,05	1,05
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 13803	2.1	2.1	>5	>5	8.4	16.8	1,05	1,05
<i>Cryptococcus neoformans</i> CECT 1078	0.26	0.52	>5	>5	0.52	1.05	0.26	0.26
<i>Epidermophyton floccosum</i> FF9	0.52	0.52	>5	>5	2.1	2.1	0.26	0.26
<i>Microsporum canis</i> FF1	0.52	0.52	>5	>5	4.2	4.2	0.26	0.26
<i>Microsporum gypseum</i> CECT 2908	1.05	1.05	>5	>5	8.4	8.4	0.26-0.52	0.26-0.52
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> FF7	1.05	1.05	>5	>5	8.4	8.4	0.26	0.26
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i> CECT 2958	4.2	4.2	>5	>5	N.T.	N.T.	0.26	0.52
<i>Trichophyton rubrum</i> CECT 2794	1.05	1.05	>5	>5	4.2	4.2	0.13	0.26
<i>Trichophyton verrucosum</i> CECT 2992	1.05	1.05	>5	>5	N.T.	N.T.	0.52	1.05
<i>Aspergillus flavus</i> F44	8.4	>8.4	>5	>5	16.8	>16.8	2.1-4.2	4.2-8.4
<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 46645	8.4	>8.4	>5	>5	16.8	16.8	1.05-2.1	2.1-4.2
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	8.4	>8.4	>5	>5	>16.8	>16.8	2.1	4.2-8.4

MIC e MLC determinadas pelo método de macrodiluição e expressas em mg mL⁻¹ (v/v);
Resultados obtidos a partir de três ensaios independentes realizados em duplicado; N.T. : não testado.

Relativamente a estudos prévios, Marongiu *et al.* (2007) apresentaram resultados relativamente a um óleo essencial de *C. maritimum*, pertencente ao mesmo quimiotipo do OE que é objeto deste estudo, também com origem em Portugal, com valores de MIC e MLC concordantes com os obtidos para as espécies *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *M. gypseum*, *M. canis* e *E. floccosum*. Em relação às espécies de *C. albicans*, *C. guilliermondii* e *C. neoformans*, o OE de *C. maritimum* apresentado neste trabalho foi mais ativo do que o estudado previamente.

Em estudos de Nabet *et al.* (2017) referentes à atividade antimicrobiana do OE de *C. maritimum* é obtido um valor de MIC de 0.092 mg/mL para *C. albicans*, inferior ao obtido neste trabalho, e por isso, mais ativo. O mesmo valor de MIC é obtido por Nabet *et al.* (2017) para *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* resistente a metilina, *Listeria innocua* e *E. coli*.

As variações apresentadas poderão estar associadas às variações de composição dos OE de *C. maritimum* dependendo da sua origem e/ou quimiotipo.

3.3.2 Inibição do tubo germinativo

O efeito de concentrações sub-inibitórias de OE de *C. maritimum* e dos seus compostos maioritários, bem como o do fluconazol na inibição do tubo germinativo de *C. albicans* é apresentado nas Tabelas II e III.

Os valores de filamentação do OE, do sabineno e do γ -terpineno foram obtidos durante o decurso deste trabalho. Os valores para o fluconazol foram estudados previamente no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Tabela II: Percentagem de filamentação de *Candida albicans* ATCC 10231 em concentrações sub-inibitórias do óleo essencial de *C. maritimum* e do fluconazol

% formação do tubo germinativo	
Ctrl ^c	100
<i>Crithmum maritimum</i>	
MIC/128 (0.015)	84.3±5.5
MIC/64 (0.03)	42.9±4.1
MIC/32 (0.06)	0.0±0.0

Fluconazol	
MIC (0.001)	101.0±5.3
2xMIC (0.002)	100.5±7.8
4xMIC (0.004)	98.9±6.1
128xMIC (0.128)	90.0±9.9
200xMIC (0.200)	89.1±5.9

Os resultados são expressos como a média de três ensaios independentes, realizados em duplicado.

Valores de concentração expressos em mg/mL

^c Amostras não tratadas, com DMSO 1%, são consideradas como controlo, com 100% de filamentação

Tabela 12: Percentagem de filamentação de *Candida albicans* ATCC 10231 em concentrações sub-inibitórias dos compostos maioritários do OE de *C. maritimum*

% formação do tubo germinativo	
Ctrl ^c	100
γ-terpineno	
MIC/32 (0.06)	100.4±2.7
MIC/16 (0.13)	67.5±1.3
MIC/8 (0.26)	0.9±1.6
MIC/4 (0.52)	0.0±0.0
Sabineno	
MIC/16 (0.03)	96.8±1.6
MIC/8 (0.06)	44.0±5.3
MIC/4 (0.13)	0.7±1.2
MIC/2 (0.26)	0.0±0.0

Os resultados são expressos como a média de três ensaios independentes, realizados em duplicado.

Valores de concentração expressos em mg/mL

^c Amostras não tratadas, com DMSO 1%, são consideradas como controlo, com 100% de filamentação

O óleo essencial demonstrou um importante efeito inibitório na formação do tubo germinativo, inibindo cerca de 60% da sua formação a uma concentração de 0.03 mg/mL e uma inibição total (100%) numa concentração trinta e duas vezes inferior ao MIC (0.06 mg/mL), o que demonstra o potencial do OE para ser usado no tratamento da candidíase.

A capacidade do OE na inibição da formação do tubo germinativo é muito superior à que se observa para os seus principais constituintes. O sabineno inibe quase completamente a uma concentração de 0.13 mg/mL (99,3%) e o γ -terpineno a uma concentração de 0.26 mg/mL inibe cerca de 99% da formação do tubo germinativo. Quando analisados os valores de filimentação obtidos para o fluconazol, observa-se que apenas inibe cerca de 10% na concentração de 0.128 mg/mL o que evidencia um maior potencial do óleo essencial relativamente ao fluconazol na inibição do tubo germinativo de *Candida albicans*.

Os resultados obtidos para a filimentação do OE permitem perspectivá-lo como um produto natural promissor a ser usado como antifúngico em infeções cujo agente etiológico é *Candida albicans*.

3.3.3 Inibição da formação de biofilmes de *C. albicans*

Relativamente à ação do óleo essencial na formação de biofilmes de *C. albicans*, os resultados obtidos para a biomassa e para a viabilidade do biofilme estão apresentados nas figuras 16 e 17.

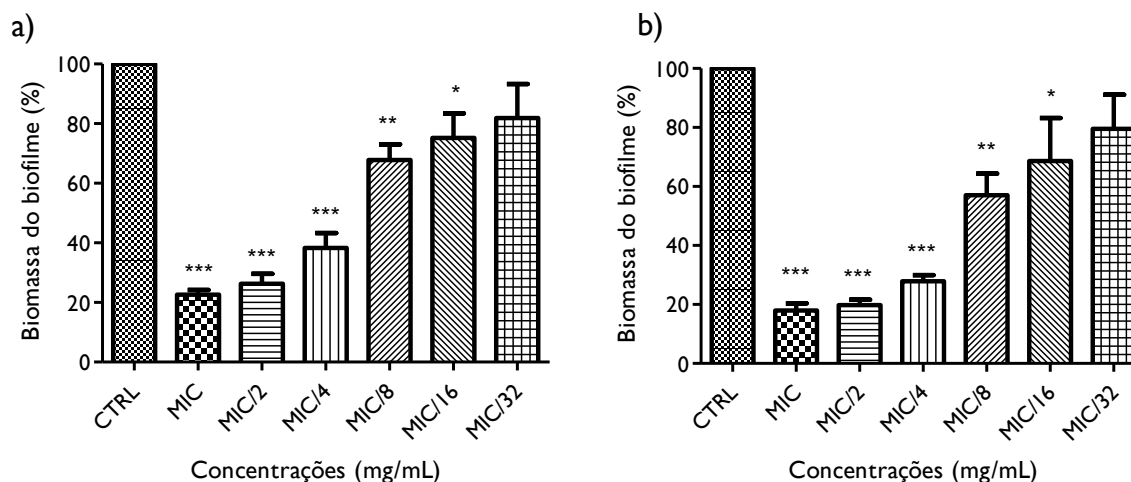


Figura 16: Biomassa do biofilme de *C. albicans* após tratamento com o óleo essencial. O gráfico a) refere-se a uma cultura de 24h e o b) de 48h, usando o ensaio de Cristal Violeta. A biomassa do biofilme foi determinada usando a fórmula $(Abs_{620nm} \text{ da amostra} / Abs_{620nm} \text{ do controlo}) * 100$. Os resultados são apresentados na forma de média \pm desvio padrão de, no mínimo, três ensaios independentes realizados em duplicado. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e

*** $p < 0.001$ em relação ao controle, usando o teste One-way ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunnet.

Quanto à ação do OE na formação de biofilmes, os resultados obtidos e apresentados na Figura 16 permitem concluir que há uma redução significativa da biomassa do biofilme por ação do OE, salientando que a percentagem de redução é significativamente superior às 48 horas. A uma concentração dezasseis vezes inferior ao MIC (0.13 mg/mL), o OE apresenta uma capacidade de redução da biomassa do biofilme de cerca de 32% às 48 horas.

Relativamente à viabilidade do biofilme (Figura 17), verificou-se que a uma concentração de OE de 0.26 $\mu\text{L/mL}$ (MIC/8), ainda há uma redução da viabilidade do biofilme de cerca de 30% às 48 horas.

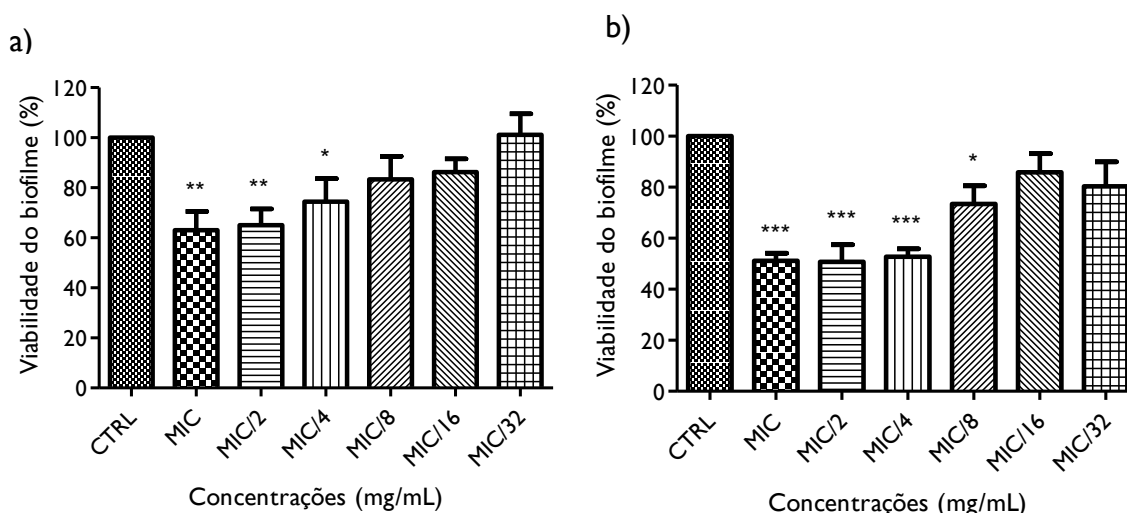


Figura 17: Viabilidade do biofilme de *C. albicans* após tratamento com o óleo essencial. O gráfico a) refere-se a uma cultura de 24h e o b) de 48h, usando o ensaio de XTT.

A viabilidade do biofilme foi determinada usando a fórmula $(\text{Abs}_{490\text{nm}} \text{ da amostra} / \text{Abs}_{490\text{nm}} \text{ do controle}) * 100$. Os resultados são apresentados na forma de média \pm desvio padrão de, no mínimo, três ensaios independentes realizados em duplicado. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ em relação ao controle, usando o teste One-way ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunnet.

Estes dados permitem concluir que o OE tem uma ação significativa na inibição da formação de biofilmes, afetando-os em termos de viabilidade e biomassa, o que permite salientar o seu potencial na inibição de fatores de virulência da *C. albicans*.

No que respeita ao fluconazol verifica-se que este apenas inibe a formação de biofilmes (cerca de 40% de inibição) a concentrações sessenta e quatro vezes superiores ao seu MIC.

O ensaio de inibição da formação de biofilmes também foi realizado para o sabineno, um dos compostos maioritários do OE, que demonstrou não ter atividade, nem em termos de redução da biomassa, nem em termos de redução da sua viabilidade. Relativamente ao γ -terpineno, outro dos compostos maioritários do OE, Raut *et al.* (2013) estudou a sua influência na formação de biofilmes, e concluiu que a atividade deste composto era diminuta para este fator de virulência da *C. albicans* (>4 mg/mL).

Considerando que o óleo essencial é uma mistura complexa de vários compostos, pode inferir-se que possa haver ações sinérgicas entre vários compostos que justifiquem a atividade na inibição da formação dos biofilmes.

3.3.4 Inibição dos biofilmes pré-formados de *C. albicans*

Os resultados obtidos na análise da atividade do OE na destruição dos biofilmes pré-formados de *C. albicans* permitiram concluir que, a concentrações de MIC a MIC/32, o OE não é ativo, tendo em conta que mantém a viabilidade e a biomassa do biofilme sem diferenças significativamente estatísticas em relação ao controlo.

4. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.1 Introdução

A deterioração de alimentos é um problema das sociedades atuais, no sentido de manter os recursos alimentares durante um maior período de tempo nas melhores condições de qualidade. Depois de considerar a deterioração microbiana, a oxidação é a segunda maior causa de deterioração alimentar (Prakash *et al.*, 2015; Lobo *et al.*, 2010). A degradação de géneros alimentícios durante o seu processamento, transporte e armazenamento está, na maioria das vezes, associada à produção de metabolitos tóxicos que resultam da degradação oxidativa dos alimentos. Isto constitui um problema considerável para a indústria alimentar, nomeadamente em termos económicos (Prakash *et al.*, 2012), que está na origem da utilização de antioxidantes como aditivos alimentares, proporcionando assim aos alimentos uma proteção contra a degradação oxidativa pelos radicais livres.

O stress oxidativo e os radicais livres também constituem uma preocupação no que se refere à homeostasia do organismo sendo que, quando o processo não é devidamente regulado, pode contribuir para a indução de várias doenças crónicas e degenerativas (Valko *et al.*, 2007). Diversos estudos referem uma associação do stress oxidativo a várias condições patológicas, como doenças cardiovasculares, cancro, distúrbios neurológicos, diabetes, isquemia, entre outros, contribuindo também para o processo de envelhecimento (Lagouge e Larsson, 2013; Pham-Huy, He e Pham-Huy, 2008).

Define-se um radical livre como qualquer espécie molecular com existência independente e que contenha um eletrão desemparelhado numa orbital atómica. A presença de um eletrão desemparelhado dá origem a determinadas propriedades partilhadas pela maioria dos radicais, nomeadamente a instabilidade e reatividade elevada (Lobo *et al.*, 2010).

Os radicais livres e outras espécies reativas de oxigénio (ROS) têm origem ou em processos metabólicos normais e essenciais do organismo humano ou em fontes externas, como a exposição a raios-X, a ozono, a poluentes, a químicos industriais e ainda ao tabagismo (Nimse e Pal, 2015). A formação de radicais livres ocorre continuamente nas células como consequência de reações enzimáticas e não enzimáticas. As reações enzimáticas que dão origem a radicais livres estão envolvidas nos mecanismos metabólicos da cadeia respiratória, da fagocitose, da síntese de prostaglandinas e do sistema citocromo P-450. Os radicais livres podem ainda ser formados a partir de reações não enzimáticas de oxigénio com compostos orgânicos (Lobo *et al.*, 2010).

Quando o balanço crítico entre a formação de radicais livres e a presença de antioxidantes é desfavorável e resulta em danos oxidativos, estamos perante uma condição

de stress oxidativo. Este processo está associado ao aparecimento de danos em diversas espécies moleculares, incluindo lípidos, proteínas e ácidos nucleicos, e vai provocar nestes uma série de alterações estruturais e funcionais (Nimse e Pal, 2015).

É neste contexto que surgem os antioxidantes, como moléculas capazes de prevenir a ocorrência de danos nos tecidos provocados pelos radicais livres, pela capacidade de prevenir a sua formação, neutralizá-los ou promover a sua degradação. Um antioxidante é, portanto, uma molécula com uma estabilidade tal, que lhe permite doar ou captar um eletrão a um radical livre, neutralizando-o e reduzindo a sua capacidade de provocar danos oxidativos. Estes antioxidantes são moléculas de baixo peso molecular com a capacidade de reagir com radicais livres e pôr fim à reação em cadeia antes de esta atingir e danificar moléculas vitais (Lobo *et al.*, 2010).

Alguns desses antioxidantes, como a glutathione, o ubiquinol e o ácido úrico, são produzidos durante o metabolismo normal do organismo. Outros antioxidantes de menor peso molecular são adquiridos através da dieta. Embora haja diversos sistemas enzimáticos no organismo com capacidade de neutralizar radicais livres, os principais antioxidantes são micronutrientes (vitaminas), como a vitamina E (α -tocoferol), vitamina C (ácido ascórbico) e o β -caroteno. O organismo não tem a capacidade de produzir estes micronutrientes e, por isso, têm que ser fornecidos através da dieta (Nimse e Pal, 2015).

Tendo em conta que o homem está cada vez mais exposto a fatores de risco para várias patologias graves, tem havido uma tendência global em torno da utilização de substâncias naturais, presentes em plantas medicinais e na dieta, como antioxidantes. É referido que há uma relação inversa entre a ingestão de plantas medicinais e alimentos ricos em antioxidantes e a incidência de determinadas patologias. Além disso, muitos compostos antioxidantes que ocorrem naturalmente em plantas foram identificados como tendo esta atividade de neutralização de radicais livres e outras espécies reativas de oxigénio (Lobo *et al.*, 2010).

A atividade antioxidante de qualquer composto ou extrato pode avaliar-se por modelos *in vitro* ou *in vivo*, de entre os quais se destaca o método do DPPH. O DPPH, 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo, é um radical livre estável, que tem a capacidade de aceitar um eletrão ou um radical de hidrogénio para se tornar numa molécula diamagnética estável (Molyneux, 2004; Lobo *et al.*, 2010).

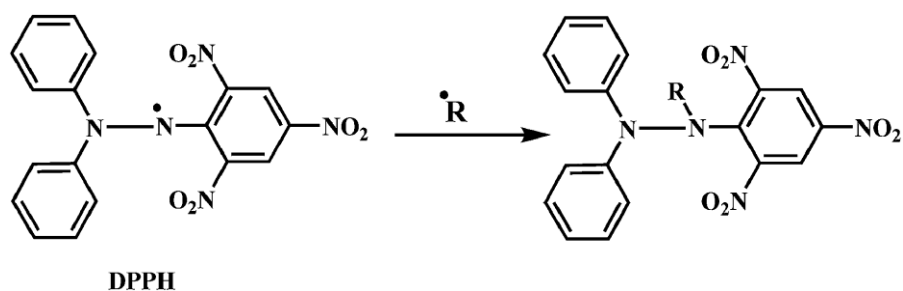


Figura 18: Reação de neutralização do radical DPPH

Devido à presença do elétron desemparelhado, a solução metanólica de DPPH apresenta uma absorção forte a 517 nm. Tal como é apresentado na Figura 18, o radical DPPH reage com um agente redutor apropriado e vai produzir uma nova ligação, que vai resultar numa mudança de cor da solução. A solução vai perder cor com o aumento da concentração de antioxidante, à medida que os elétrons são transferidos para o radical DPPH a partir do antioxidante.

Esta reatividade tem sido usada para testar a capacidade de compostos e extratos de plantas em termos de neutralização de radicais livres. A redução dos radicais DPPH pode ser monitorizada espectrofotometricamente por um decréscimo de absorvância a 517 nm (Molyneux, 2004; Lobo *et al.*, 2010).

4.2 Material e métodos

Os estudos já publicados têm mostrado que o óleo essencial de *C. maritimum* apresenta uma atividade antioxidante baixa (Generalic Mekinić *et al.*, 2016), não tendo demonstrado qualquer atividade na neutralização do radical DPPH (Kulisic-Bilusic *et al.*, 2010). Por outro lado, os estudos que existem sobre extratos desta planta contendo compostos não voláteis comprovaram que os mesmos possuem atividade antioxidante (Generalic Mekinić *et al.*, 2016; Siracusa *et al.*, 2011; Meot-Duros e Magné, 2009), sendo esta atribuída aos compostos fenólicos. Por essa razão optou-se por avaliar apenas a atividade antioxidante da AHD, obtida previamente por hidrodestilação, tal como descrito na secção 2.2.3.

4.2.1 Método de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)

A atividade antioxidante da AHD foi avaliada segundo o método de DPPH descrito por Blois (1958). Um volume de 100 µL da AHD, a diferentes concentrações, foi adicionado a 1 mL de tampão acetato (100mM) a pH 6.0 e a 1,4 mL de metanol. Foi posteriormente adicionado um volume de 500 µL de solução metanólica de DPPH (500µM) e agitou-se em vórtex durante 30 segundos.

A reação ocorreu ao abrigo da luz e à temperatura ambiente, durante 30 minutos. O decréscimo do valor de absorvância da solução de DPPH foi medido num espectrofotómetro de duplo feixe, Cintra 101 (GBC, Austrália), a 517 nm, contra um branco. Os resultados foram obtidos pela diferença entre a absorvância do controlo e do ensaio, num mínimo de 3 ensaios independentes.

4.2.2 Método bioautográfico

O método bioautográfico combina a separação cromatográfica, por TLC, com a determinação da atividade *in situ*, facilitando assim a localização de compostos ativos numa mistura, como um extrato de plantas.

Com vista à pesquisa de antioxidantes na AHD em estudo, após a realização de uma TLC da amostra, a placa foi pulverizada com DPPH. A presença de manchas amarelas corresponde à redução do radical DPPH, que evidencia a presença de fitoquímicos com capacidade de neutralização radicalar, ou seja, com propriedades antioxidantes.

4.3 Resultados e Discussão

A atividade antioxidante da AHD foi avaliada por dois métodos, o método de DPPH e o método bioautográfico. Este segundo método permitiu avaliar quais os compostos presentes no extrato que contribuem mais para a atividade antioxidante.

O método de DPPH permitiu o cálculo do IC₅₀ de atividade antioxidante da AHD. Com isto, obteve-se o valor apresentado na Tabela 13, que corresponde à concentração de AHD com capacidade para captar 50% do radical DPPH.

Tabela 13: Atividade antioxidante da água de hidrodestilação de *C. maritimum*

Amostra	IC 50 ¹ (Média ± Desvio Padrão)
AHD	0.68 ± 0.16

¹: mg de extrato seco por mL de mistura reacional

Resultado obtido como a média de três ensaios independentes

A aplicação do método bioautográfico permite perceber que existem compostos na AHD com atividade antioxidante e identificá-los na TLC (Figura 21). Conjugando a informação já obtida na TLC relativa à caracterização fitoquímica da AHD, podem identificar-se os compostos 1, 2, 4, 5 e 7 como os que contribuem mais para a atividade antioxidante, sendo que os compostos 4 e 5 são os que apresentam uma mancha amarela mais intensa.

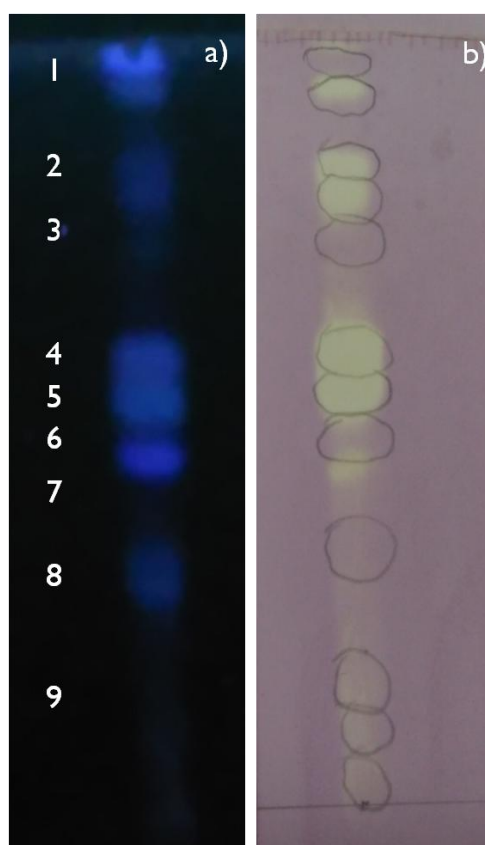


Figura 19: Detecção de compostos antioxidantes por pulverização de TLC com DPPH. A placa a) corresponde à observação à luz UV, antes da pulverização com DPPH e a placa b) corresponde à revelação com DPPH.

Conclui-se então que os compostos que mais contribuem para esta atividade biológica são os ácidos fenólicos (manchas 1,2,4,5) e o flavonol (mancha 7), sendo o ácido clorogénico (mancha 4) um dos que mais contribui para a atividade.

Outros estudos referem o potencial antioxidante de extratos de compostos não voláteis de *C. maritimum*. Meot-Duros e Magné (2009) referencia, para um extrato metanólico, um IC₅₀ que varia entre 0.146 ± 0.02 e $1,211 \pm 0.01$ mg/mL, dependendo da estação do ano em que a planta é colhida. No Verão, estação do ano que corresponde à analisada neste projeto, o valor obtido por Meot-Duros e Magné (2009) é de 0.245 ± 0.01 mg/mL. Este valor revela uma atividade antioxidante superior à obtida neste trabalho, de 0.68 ± 0.16 mg/mL, o que poderá ser justificado pela diferença no tipo de extrato, sendo que um é extrato metanólico a partir das folhas de *C. maritimum* e o outro uma água de hidrodestilação. O estudo de Meot-Duros e Magné (2009) apresenta ainda dados que referem uma boa correlação entre a atividade de neutralização dos radicais DPPH e ABTS e os níveis de fenólicos totais, particularmente de ácido clorogénico.

Siracusa *et al.* (2011) referem uma atividade antioxidante forte de infusões de *C. maritimum*, de cerca de 88% a uma concentração de 0.4 g/L. Este estudo refere-se à neutralização de radicais livres do extrato quando comparado com antioxidantes comerciais. Siracusa *et al.* (2011) salientam ainda o ácido clorogénico como o principal responsável pela atividade antioxidante de extratos de *C. maritimum*.

Isto releva, uma vez mais, a influência particular deste composto fenólico no potencial antioxidante dos extratos. Seria importante perceber a quantidade de ácido clorogénico na AHD e perceber se uma menor concentração deste ácido fenólico poderá diminuir a atividade antioxidante deste extrato.

5. ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

5.1 Introdução

A inflamação é uma resposta adaptativa do sistema imunológico, que ocorre com o objetivo de restabelecer a homeostasia do organismo após determinado estímulo, como uma infecção ou uma lesão de tecidos. O processo inflamatório envolve o recrutamento e ativação de determinadas células do sistema imunológico, de entre as quais se destacam os macrófagos. Os macrófagos ativados são responsáveis pela produção de vários mediadores pró-inflamatórios, como citocinas pró-inflamatórias, óxido nítrico (NO), prostaglandinas (PGs) e espécies reativas de oxigênio (ROS) (Medzhitov, 2008).

O NO é uma importante molécula de sinalização intracelular e intercelular produzida pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), a partir do aminoácido L-arginina e oxigênio molecular. Existem três isoformas da NOS, nomeadamente a NOS endotelial (eNOS), a NOS neuronal (nNOS) e a NOS indutível (iNOS). As duas primeiras são expressas constitutivamente e a sua ativação requer um aumento do teor de cálcio intracelular, mas a iNOS é induzida por estímulos inflamatórios, como LPS (lipopolissacarídeo) ou citocinas (Aktan, 2004; Mori e Gotoh, 2000).

Enquanto que a NOS está envolvida na produção de NO, a ciclooxigenase (COX) catalisa a reação de formação de PGs via ácido araquidónico. A iNOS e a COX-2 são formas indutíveis destas enzimas que podem ativar-se mediante vários estímulos inflamatórios (citocinas, radicais livres, patogénicos infecciosos). Os mecanismos da iNOS e da COX-2 estão interligados, na medida em que o NO pode estimular a ação da COX-2, ligando-se ao seu grupo heme (Dudhgaonkar *et al.*, 2004).

As PGs ampliam o mecanismo da dor e aumentam a permeabilidade vascular em quadro de inflamação (González, Houghton e Houlst, 2003), enquanto que a libertação de NO contribui para um desenvolvimento das doenças inflamatórias (Guzik, Korbut e Adamek-Guzik, 2003).

O NO é um mediador pró-inflamatório, produzido em grandes quantidades durante um processo inflamatório. Desta forma, o modelo *in vitro* de macrófagos estimulados com LPS, que induz um aumento da produção de NO e mimetiza uma condição inflamatória do organismo, tem sido amplamente utilizado para investigação do potencial anti-inflamatório de extratos de plantas, bem como dos seus óleos essenciais e compostos isolados (Valente *et al.*, 2013; Alves-Silva *et al.*, 2016).

Este estudo permite ter uma ideia acerca do potencial anti-inflamatório destes compostos e evitar a utilização de animais de experimentação nesta fase precoce do desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.

É de salientar que respostas inflamatórias exacerbadas podem estar na origem de diversas doenças, como o cancro (Grivennikov, Greten e Karin, 2010; Reuter *et al.*, 2010), a obesidade (Singer e Lumeng, 2017), a diabetes (Greevenbroek, Schalkwijk e Stehouwer, 2018), as doenças cardiovasculares (García, Zazueta e Aguilera-Aguirre, 2017) e o envelhecimento (Sanada *et al.*, 2018).

Desta forma, torna-se importante o desenvolvimento de investigação nesta área, no sentido de identificar substâncias que possam promover uma melhoria deste processo inflamatório e contribuir para uma homeostasia e equilíbrio do organismo. Em termos de farmacoterapia, a medicina tradicional contribui para esta atividade anti-inflamatória, nomeadamente em países em desenvolvimento (Recio, Andujar e Rios, 2012). As plantas medicinais são, assim, uma fonte relevante para a procura de moléculas biologicamente ativas, que possam considerar-se potenciais novos anti-inflamatórios.

5.2 Material e Métodos

A atividade anti-inflamatória do óleo essencial e da AHD foi analisada experimentalmente em modelos celulares, avaliando parâmetros como a produção de nitritos e a determinação da viabilidade celular.

5.2.1 Linhas celulares

Para o estudo da atividade anti-inflamatória, foi cedida pela Dra. Otilia Vieira (Centro de Neurociências e Biologia Celular, Universidade de Coimbra, Portugal) uma linha celular de macrófagos de rato (Raw 264.7), com origem na *American Type Culture Collection*.

As células foram mantidas em cultura em Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), um meio suplementado com 10% de soro fetal de bovino não-inativado, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, a 37 °C numa atmosfera humidificada, com 95% de ar e 5% de CO₂. As células viáveis foram contabilizadas em câmara de Neubauer, com recurso ao corante azul *Trypan*. Durante os ensaios, as células foram monitorizadas por microscópio ótico, para detetar quaisquer alterações morfológicas.

Para a realização dos ensaios, as células foram plaqueadas, numa concentração de 0.3×10^6 células/mL, para um volume de meio de 600 μ L e deixadas a estabilizar por 12 horas. Após este período de estabilização, as células foram mantidas em meio de cultura (controlo) ou foi-lhes adicionado óleo essencial/AHD, nas concentrações definidas. As células foram ainda estimuladas com LPS a 0.001 mg/mL, sendo novamente incubadas por um período de 24 horas.

5.2.2 Avaliação do potencial anti-inflamatório de óleo e AHD *in vitro*

A produção de óxido nítrico (NO) foi avaliada pela acumulação de nitritos no sobrenadante da cultura, usando uma reação colorimétrica com o reagente de Griess [0.1% (m/v) dicloridrato de N-(1 naftil)-etilenodiamina e 1% (m/v) sulfanilamida contendo 5% (m/v) de H_3PO_4] (Green *et al.*, 1982).

Assim, foram misturados 170 μ L do sobrenadante da cultura com igual volume do reagente de Griess. A reação decorreu durante 30 minutos ao abrigo da luz. A absorvância foi medida a 550 nm num leitor de placas ELISA (SLT, Áustria) e usou-se o meio de cultura como branco.

5.2.3 Avaliação da viabilidade celular

As células metabolicamente ativas foram avaliadas pelo ensaio da resazurina, baseado na capacidade das células viáveis de converter a resazurina (azul não fluorescente) em resorufina (rosa fluorescente) (Rampersad, 2012). A quantidade de resorufina produzida é diretamente proporcional ao número de células viáveis.

As células foram incubadas com uma solução de resazurina por 2 horas a 37 °C, em estufa de atmosfera humidificada, com 95% de ar e 5% de CO_2 . A absorvância foi medida a 570 nm num leitor de placas ELISA (SLT, Áustria), usando um filtro de referência a 620 nm.

5.3 Análise estatística

A análise estatística foi realizada recorrendo à versão 5.02 do programa GraphPad Prism (GraphPad Software, CA, USA). Os resultados obtidos foram expressos em média \pm desvio padrão da média do número de ensaios independentes realizado (N=3).

Para proceder à comparação entre grupos controlo e os diferentes grupos tratados com óleo essencial/AHD, procedeu-se à realização do teste one-way ANOVA, seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunnett.

5.4 Resultados e discussão

A atividade anti-inflamatória do óleo essencial de *C. maritimum* foi avaliada tendo em conta a sua capacidade de inibir a produção de NO, sem redução da viabilidade celular. Os resultados referentes a estes parâmetros são apresentados na Figura 20.

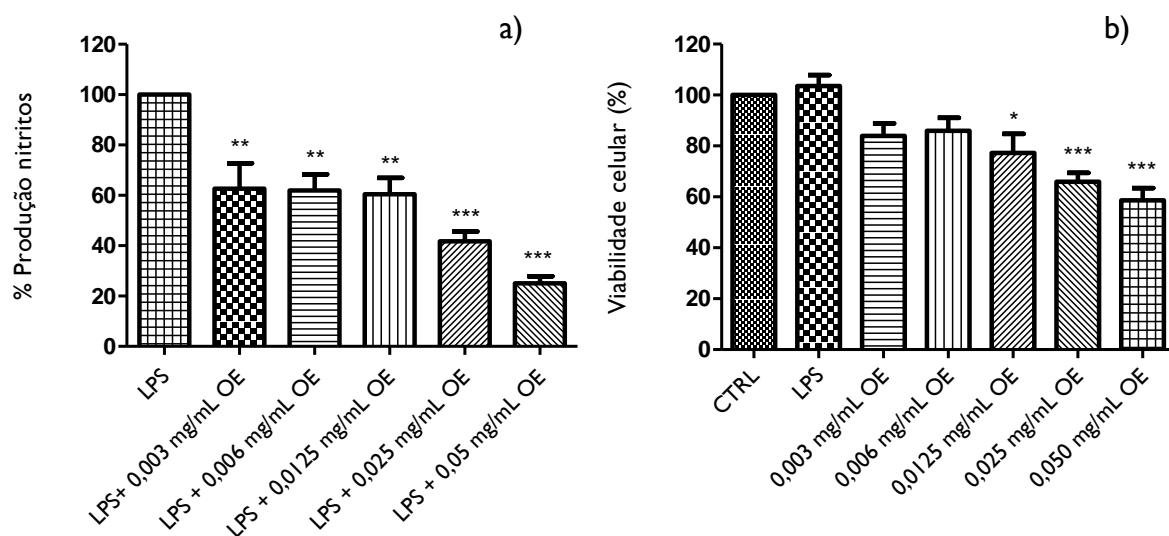


Figura 20: Efeito do OE de *C. maritimum* na produção de nitritos por macrófagos estimulados com LPS (a) e na sua viabilidade celular (b).

As células foram mantidas em meio de cultura (controlo), incubadas com 0.001 mg/mL de LPS ou com LPS na presença de diferentes concentrações de OE (0.003-0.05 mg/mL), por 24 horas. Os resultados são expressos como percentagem de produção de nitritos pelas células na presença de LPS (a) e como percentagem de viabilidade celular (ensaio da resazurina) (b). Cada valor corresponde à média \pm desvio padrão da média (SEM) de três ensaios independentes, realizados em duplicado. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$, comparando com o LPS)

Os resultados apresentados na Figura 20 mostram uma redução significativa (** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$) da produção de nitritos em macrófagos estimulados com LPS nas concentrações de OE de 0.003 e 0.006 mg/mL (Figura 20a), sem comprometer a viabilidade celular (Figura 20b).

Relativamente à viabilidade celular, em concentrações de 0.0125-0.05 mg/mL o OE de *C. maritimum* apresentou resultados que revelam toxicidade para as células.

Na concentração de 0.003 mg/mL há uma redução da produção de NO de $37 \pm 10.09\%$. Verifica-se ainda uma redução significativa da produção de NO em concentrações superiores a 0.006 mg/mL, às quais o OE já apresenta toxicidade. Para justificar esta diminuição da produção de NO pode sugerir-se a possibilidade de morte celular ou de inibição do metabolismo dos macrófagos sendo que, nestas condições, a diminuição do NO não está associada ao potencial anti-inflamatório do OE.

Foi também avaliado o potencial anti-inflamatório da AHD num intervalo de concentrações de 0.069 a 1.104 mg/mL mas não revelou atividade. Para o OE, o valor de IC_{50} obtido foi de 0.01225 mg/mL (tabela 14).

Tabela 14: Atividade anti-inflamatória do OE e da água de hidrodestilação de *C. maritimum*

Amostra	IC 50¹ (Média ± Desvio Padrão)
Óleo essencial	0.01225 ± 0.00192
AHD	-

¹: resultados obtidos em mg/mL

Resultado obtido como a média de três ensaios independentes

Os resultados obtidos permitem demonstrar o potencial anti-inflamatório do óleo essencial de *C. maritimum*, cujos compostos maioritários são o γ -terpineno e o sabineno, pela sua capacidade de inibir significativamente a produção de NO em macrófagos estimulados com LPS, a concentrações que não comprometem a viabilidade celular (0.003 e 0.006 mg/mL).

Foram previamente descritas propriedades anti-inflamatórias dos compostos maioritários do OE de *C. maritimum*. Em estudos de Valente *et al.* (2013a, 2013b) utilizando o mesmo modelo, foi avaliado isoladamente o potencial anti-inflamatório de sabineno, concluindo que este composto só é ativo em concentrações superiores (1,05 mg/mL) às consideradas de OE de *C. maritimum*, nomeadamente pela sua capacidade de inibição da produção de NO.

Óleos essenciais em que o sabineno é um dos compostos maioritários, como *Oenanthe crocata* L. (Valente *et al.*, 2013a) e *Margotia gummifera* (Valente *et al.*, 2013b), duas espécies de Apiaceae, revelam ter atividade anti-inflamatória, embora o óleo de *C. maritimum* estudado neste trabalho tenha revelado um potencial anti-inflamatório muito superior.

Relativamente ao γ -terpineno, estudos de Ramalho *et al.* (2015) referem a sua ação anti-inflamatória em ratinhos, concluindo que este composto é um potencial candidato para o tratamento de doenças inflamatórias agudas, tendo em conta que o seu mecanismo de ação envolve a modulação de vários parâmetros característicos da inflamação.

A atividade destes compostos maioritários poderá explicar o potencial anti-inflamatório do OE, embora possa haver também contribuição de outros componentes minoritários do OE. Neste contexto, seria importante completar este estudo avaliando os efeitos noutros mediadores inflamatórios, como citocinas e prostaglandinas, e clarificando o mecanismo de ação associado a esta atividade biológica, nomeadamente nas vias de sinalização pró-inflamatórias, como o NF- κ B e a MAPK (proteína cinase ativada por mitogénios).

6. CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

Crithmum maritimum é uma planta aromática reconhecida particularmente na zona do Mediterrâneo pelas suas diversas utilizações em termos alimentares, etnofarmacológicos e pelo interesse comercial do seu óleo essencial.

A obtenção do óleo essencial (OE) por hidrodestilação origina elevada quantidade de água residual (AHD) que é, normalmente, desperdiçada. No sentido de avaliar a possibilidade de rentabilizar esta AHD foi feita a sua caracterização química e foi avaliado o seu potencial bioativo, particularmente, as suas atividades antifúngica, anti-inflamatória e antioxidante. Foram igualmente caracterizados os principais compostos do óleo essencial e avaliadas as atividades antifúngica e anti-inflamatória. No que respeita a esta última atividade não havia dados prévios descritos na bibliografia.

Relativamente ao OE foram identificados três compostos maioritários: γ -terpineno, sabineno e timol metil éter. A AHD contém principalmente ácidos fenólicos e pequenas quantidades de flavonóides, nomeadamente, uma flavona e um flavonol que não tinham sido referidos em estudos prévios de extratos de compostos não voláteis de *C. maritimum*. A presença de ácido clorogénico como um dos compostos maioritários foi confirmada com um padrão comercial.

Seria importante para investigação futura o isolamento e identificação dos compostos fenólicos da AHD, complementando a informação obtida por HPLC-PDA com a espetrometria de massa. A quantificação dos compostos da AHD também poderia constituir uma informação importante, na tentativa de perceber se o facto de não ter demonstrado atividade antifúngica e anti-inflamatória se deve a uma concentração muito reduzida dos seus compostos bioativos, uma vez que há dados da atividade destes compostos isolados.

No que se refere à atividade antifúngica, foi avaliado o potencial do OE e da AHD no que diz respeito a leveduras e fungos filamentosos (*Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, dermatófitos e *Aspergillus* spp.), conhecidos como agentes patogénicos de patologias fúngicas prevalentes. A avaliação da concentração mínima inibitória (MIC) e da concentração letal mínima (MLC) evidenciou propriedades antifúngicas para o óleo essencial, sendo a a estirpe mais sensível o *Cryptococcus neoformans* (MIC de 0.26 mg/mL), enquanto que a AHD não demonstrou atividade antifúngica significativa (MIC e MLC >5 mg/mL).

No que respeita ao óleo essencial foi também avaliada a sua ação em fatores de virulência de *Candida albicans*. No que diz respeito à inibição do tubo germinativo, o OE demonstrou capacidade de o inibir a 100% a uma concentração de 0.06 mg/mL. Demonstrou ainda um potencial inibitório relativamente à formação de biofilmes, reduzindo a biomassa do biofilme às 48 horas em cerca de 32% a uma concentração dezasseis vezes inferior ao

MIC (0.13 $\mu\text{L/mL}$) e reduzindo a viabilidade em cerca de 30% às 48 horas, a uma concentração de 0.26 $\mu\text{L/mL}$ (MIC/8).

Considerando que a estirpe mais sensível é o *Cryptococcus neoformans* seria importante futuramente avaliar os mecanismos de ação inerentes a essa atividade, bem como ampliar o estudo a outros fungos patogênicos, incluindo os fitopatogênicos.

No que respeita à atividade antioxidante, atendendo a que estudos prévios referiam um potencial antioxidante reduzido para o OE, estudou-se apenas a capacidade de neutralização do radical DPPH para a AHD. Foi obtido um IC_{50} de 0.68 ± 0.16 mg/mL e, pelo método bioautográfico, foi possível associar o potencial antioxidante a determinados compostos presentes na AHD, como os ácidos fenólicos e o flavonol, salientando-se o ácido clorogênico como principal responsável por esta atividade biológica. A linha de estudo da atividade antioxidante da AHD poderia futuramente ser alargada a testes orientados para espécies reativas de oxigênio.

Relativamente à atividade anti-inflamatória, sobre a qual, tanto quanto é do nosso conhecimento, não havia qualquer estudo prévio, foi avaliada a capacidade da AHD e do OE para inibir a produção de NO em macrófagos estimulados com LPS. Os resultados permitiram concluir que o OE apresentou um IC_{50} de 0.01225 ± 0.00192 mg/mL, enquanto que a AHD não demonstrou atividade às concentrações testadas (de 0.069 a 1.104 mg/mL). A aplicação do OE permitiu uma redução significativa da produção de óxido nítrico em macrófagos estimulados com LPS a uma concentração de 0,003 mg/mL, sem comprometer a viabilidade celular. O potencial anti-inflamatório do OE poderá justificar-se pela ação dos seus compostos majoritários. Para completar este estudo, seria ainda importante avaliar os efeitos do OE noutros mediadores inflamatórios, como citocinas e prostaglandinas, clarificando o mecanismo de ação associado a esta atividade biológica, nomeadamente nas vias de sinalização pró-inflamatórias, como o NF- κ B e a MAPK (proteína cinase ativada por mitogénios).

Em suma, os resultados obtidos sugerem que o óleo essencial de *C. maritimum* tem diversas atividades biológicas de relevância, salientando a atividade anti-inflamatória a concentrações que não comprometem a viabilidade celular. Sugerem, ainda, que o desperdício da água residual da indústria de extração de óleos essenciais de *C. maritimum*, por hidrodestilação, pode vir a proporcionar aplicações, nomeadamente em termos de atividade antioxidante.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKTAN, Fügen - **iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation**. Life Sciences. . ISSN 00243205. 75:6 (2004) 639–653. doi: 10.1016/j.lfs.2003.10.042.
- AL-DASHTI, Yousef A. *et al.* - **Dietary Flavanols: A Review of Select Effects on Vascular Function, Blood Pressure, and Exercise Performance**. Journal of the American College of Nutrition. . ISSN 0731-5724. 0:0 (2018) 1–15. doi: 10.1080/07315724.2018.1451788.
- ALVES-SILVA, Jorge M. *et al.* - **New Claims for Wild Carrot (*Daucus carota* subsp. *carota*) Essential Oil**. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine. . ISSN 17414288. 2016:2016). doi: 10.1155/2016/9045196.
- ASBAHANI, A. EL; MILADI, K.; BADRI, W.; SALA, M.; ADDI, E. H.ĀĪT; CASABIANCA, H.; MOUSADIK, A. EL; HARTMANN, D.; JILALE, A.; RENAUD, F. N.R.; ELAISSARI, A. - **Essential oils: From extraction to encapsulation**. International Journal of Pharmaceutics. . ISSN 18733476. 483:1–2 (2015) 220–243. doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.12.069.
- ATIA, ABDALLAH; BARHOUMI, ZOUHAIER; MOKDED, RABHI; ABDELLY, CHEDLY; SMAOUI, Abderrazak - **Environmental eco-physiology and economical potential of the halophyte *Crithmum maritimum* L. (Apiaceae)**. Journal of Medicinal Plants Research. . ISSN 1996-0875. 5:16 (2011) 3564–3571.
- BAKKALI, F. *et al.* - **Biological effects of essential oils – A review**. Food and Chemical Toxicology. . ISSN 02786915. 46:2 (2008) 446–475. doi: 10.1016/j.fct.2007.09.106.
- BARROSO, Jose G. *et al.* - **Seasonal Variation in the Composition of the Essential Oil of *Crithmum maritimum* L.** Flavour and Fragrance Journal. 7:1992) 147–150.
- BASER, K. H. C.; DEMIRCI, Fatih - Chemistry of Essential Oils. Em BERGER, R. G. (Ed.) - Flavours and Fragrances - Chemistry, Bioprocessing and Sustainability. Berlin : Springer, (2007). p. 43–86.
- BINDER, U.; LASS-FLÖRL, C. - **Epidemiology of invasive fungal infections in the Mediterranean area**. Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases. . ISSN 20353006. 3:1 (2011). doi: 10.4084/MJHID.2011.016.
- Skin cream**. BLOCK, A.; WAGNER, G. patente International Patent Number WO20050232122005,
- BONGOMIN, Felix *et al.* - **Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases—Estimate Precision**. Journal of Fungi. . ISSN 2309-608X. 3:4 (2017) 57. doi: 10.3390/jof3040057.
- BRATT, Katharina - **Secondary Plant Metabolites as Defense against Herbivores and Oxidative Stress**. ISBN 9155448070.
- BRATTON, Emily W. *et al.* - **Comparison and temporal trends of three groups with cryptococcosis: HIV-infected, solid organ transplant, and hiv-negative/non-transplant**. PLoS ONE. . ISSN 19326203. 7:8 (2012). doi: 10.1371/journal.pone.0043582.

BROWN, GORDON D.; DENNING, DAVID W.; GOW, NEIL A R; LEVITZ, STUART M.; NETEA, MIHAI G.; WHITE, Theodore C. - **Hidden killers: Human fungal infections.** Science Translational Medicine. . ISSN 19466234. 4:165 (2012). doi: 10.1126/scitranslmed.3004404.

BRUNETON, Jean - **Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales.** Tec & Doc Lavoisier. 4^a ed.:2009).

BUCHBAUER, Gerhard - **The Detailed Analysis of Essential Oils Leads to the Understanding of their Properties a.** Perfumer&Flavorist. . ISSN 0272-2666. 25:April (2000) 64–67.

BURLEY, J.; YOUNGQUIST, John; EVANS, Julian - **Encyclopedia of forest sciences** [Em linha]. [S.l.] : Elsevier, (2004) [Consult. 17 jan. 2018]. Disponível em WWW:<URL:https://books.google.pt/books?id=O4eMWqdluM8C&dq=encyclopedia+of+forest+sciences+2004&lr=&hl=pt-PT&source=gbs_navlinks_s>. ISBN 0080548016.

CARRILLO-MUNOZ, A. J. *et al.* - **Antifungal agents: mode of action in yeast cells.** Revista espanola de quimioterapia : publicacion oficial de la Sociedad Espanola de Quimioterapia. . ISSN 0214-3429. 19:2 (2006) 130–139.

CHRISTENSEN, L.; BRANDT, K. - **Bioactive polyacetylenes in food plants of the Apiaceae family: occurrence, bioactivity and analysis.** J. Pharm. Biomed. 41(3):2006) 683–93.

CLSI - **Reference Method for Broth Dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved Standard M27-A3 - Third Edition.** Clinical and Laboratory Standards Institute 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA : [s.n.]. ISBN ISBN 1-56238-666-2.

COUNCIL OF EUROPE - **European Pharmacopoeia 7th Edition.** ISBN 978-92-871-6700-2.

DAGLIA, Maria - **Polyphenols as antimicrobial agents.** Current Opinion in Biotechnology. . ISSN 09581669. 23:2 (2012) 174–181. doi: 10.1016/j.copbio.2011.08.007.

DESALERMOS, Athanasios; KOURKOUNPETIS, Themistoklis K.; MYLONAKIS, Eleftherios - **Update on the epidemiology and management of cryptococcal meningitis.** Expert Opinion on Pharmacotherapy. . ISSN 1465-6566. 13:6 (2012) 783–789. doi: 10.1517/14656566.2012.658773.

DÍAZ-MAROTO, M.C.; PÉREZ-COELLO, M.S.; ESTEBAN, J.; SANZ, J. - **Comparison of the volatile composition of wild fennel samples (*Foeniculum vulgare* mill.) from central Spain.** J. Agric. Food Chem. 54:2006) 6814–6818.

DUDHGAONKAR, Shailesh P. *et al.* - **Interaction of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 inhibitors in formalin-induced nociception in mice.** European Journal of Pharmacology. . ISSN 00142999. 492:2–3 (2004) 117–122. doi: 10.1016/j.ejphar.2004.03.021.

FAO - **Global agriculture towards 2050.** High Level Expert Forum-How to feed the

world 2050. 2009) 1–4. doi:
http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/Issues_papers/HLEF2050_Global_Agriculture.pdf.

FRAGA, Cesar G. - **Plant phenolics and human health : biochemistry, nutrition, and pharmacology.** [S.l.] : Wiley, (2010). ISBN 9780470531792.

FRESCO, P. *et al.* - **New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols.** Medicinal Research Reviews. . ISSN 0198-6325. 26:6 (2006) 747–766. doi: 10.1002/med.20060.

GARCÍA, N.; ZAZUETA, C.; AGUILERA-AGUIRRE, L. - **Oxidative Stress and Inflammation in Cardiovascular Disease.** Oxidative Medicine and Cellular Longevity. . ISSN 19420994. 2017:2017) 2–4. doi: 10.1155/2017/5853238.

GENERALIĆ MEKINIĆ, Ivana *et al.* - **Sea fennel (*Crithmum maritimum* L.): phytochemical profile, antioxidative, cholinesterase inhibitory and vasodilatory activity.** Journal of Food Science and Technology. . ISSN 09758402. 53:7 (2016) 3104–3112. doi: 10.1007/s13197-016-2283-z.

GHANEM, M.; RADWAN, H.; MAHDY, E. - **Phenolic compounds from *Foeniculum vulgare* (Subsp: piperitum)(Apiaceae) herb and evaluation of hepatoprotective antioxidant activity.** Pharmacognosy. 4:2012) 104–108.

GONZÁLEZ, S. B.; HOUGHTON, P. J.; HOULT, J. R. S. - **The activity against leukocyte eicosanoid generation of essential oil and polar fractions of *Adesmia boronioides* hook.f.** Phytotherapy Research. . ISSN 0951418X. 17:3 (2003) 290–293. doi: 10.1002/ptr.1118.

GREEN, Laura C. *et al.* - **Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids.** Analytical Biochemistry. . ISSN 10960309. 126:1 (1982) 131–138. doi: 10.1016/0003-2697(82)90118-X.

GREEVENBROEK, Marleen M. J. Van; SCHALKWIJK, Casper G.; STEHOUWER, Coen D. A. - **Inflammation and Type 2 Diabetes 47 . 2 Diabetes – Background and Epidemiology.** 2018) 1225–1253.

GRIVENNIKOV, Sergei I.; GRETEN, Florian R.; KARIN, Michael - **Immunity, Inflammation, and Cancer.** Cell. . ISSN 00928674. 140:6 (2010) 883–899. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.025.

GULATI, Megha; NOBILE, Clarissa J. - ***Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms.** Microbes Infection. . ISSN 12864579. 18:5 (2016) 310–321. doi: 10.1016/j.micinf.2016.01.002.Candida.

GUPTA, K. Aditya; COOPER, Elizabeth A. - **Update in Antifungal Therapy of Dermatophytosis.** Mycopathologia. . ISSN 13534882. 166:2008) 353–367. doi: 10.1007/s11046-008-9109-0.

GUZIK, T. J.; KORBUT, R.; ADAMEK-GUZIK, T. - **Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation.** Journal of physiology and pharmacology : an

official journal of the Polish Physiological Society. . ISSN 0867-5910. 54:4 (2003) 469–487. doi: 10.1385/1-59259-374-7.

HADRICH, Inès *et al.* - **Invasive Aspergillosis: Resistance to Antifungal Drugs.** Mycopathologia. . ISSN 0301486X. 174:2 (2012) 131–141. doi: 10.1007/s11046-012-9526-y.

HAHN-DEINSTROP, Elke - **Applied Thin-Layer Chromatography: Best Practice and Avoidance of Mistakes.** 2nd. ed. [S.l.] : Wiley, VCH, (2006). ISBN 978-3-527-31553-6.

HAVLICKOVA, B; CZAICA, VA;; FREDRICH, M. - **Epidemiological trends in skin mycosis worldwide.** Mycosis. 51:4 (2008) 2–15. doi: 10.1111/j.1439-0507.2008.01606.

ISHIKAWA, T.; KUDO, M.; KITAJIMA, J. .. - **Water-Soluble constituents of dill.** Chem. Pharm. Bull. 50:2002) 501–507.

ISO 9235 - **Aromatic natural raw materials -- Vocabulary**

ISO TC 54 - **Aromatic Natural Raw Materials - Vocabulary.** 1997).

IVANOVA, D.; GEROVA, D.; CHERVENKOV, T.; YANKOVA, T. - **Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants.** Journal of Ethnopharmacology. . ISSN 03788741. 96:1–2 (2005) 145–150. doi: 10.1016/j.jep.2004.08.033.

KNEES, S. G. - **Apium, Cicuta, Crithmum, Cyclosporum, Kundmannia, Magydaris, Lilaeopsis.** in Nieto Feliner, G., Jury, S.L. & Herrero, A. (eds.) Flora Iberica Vol. X Araliaceae-Umbelliferae, Real Jardin Botánico. 2003) 195–197.

KOPPULA, S.; CHOI, D. K. - **Cuminum cyminum extract attenuates scopolamine-induced memory loss and stress-induced urinary biochemical changes in rats: a noninvasive biochemical approach.** Pharm. Biol. 49:2011) 702–708.

KULISIC-BILUSIC, T. *et al.* - **Evaluation of the antioxidant activity of essential oils from caper (Capparis spinosa) and sea fennel (Crithmum maritimum) by different methods.** Journal of Food Biochemistry. . ISSN 01458884. 34:SUPPL. 1 (2010) 286–302. doi: 10.1111/j.1745-4514.2009.00330.x.

KUPPUSAMY, P.; YUSOFF, M. M.; MANIAM, G. P.; ICHWAN, S. J. A.; SOUNDHARRAJAN, I.; GOVINDAN, N. - **Nutraceuticals as potential therapeutic agents for colon cancer: a review.** Acta Pharmaceutica Sinica B. . ISSN 22113835. 4:3 (2014) 173–181. doi: 10.1016/j.apsb.2014.04.002.

KWON-CHUNG, Kyung J. *et al.* - **Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii, the Etiologic Agents of Cryptococcosis.** 2016) 1–28. doi: Kwon-Chung, K. J., Fraser, J. A., Doering, T. L., Wang, Z., Janbon, G., Idnurm, A., et al. (2014). Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii, the etiologic agents of cryptococcosis. Cold Spring Harb Perspect. Med. 4:a019760. doi: 10.1101/cshperspect.a019760.

LAGOUGE, M.; LARSSON, N. G. - **The role of mitochondrial DNA mutations and free radicals in disease and ageing.** Journal of Internal Medicine. . ISSN 09546820. 273:6 (2013) 529–543. doi: 10.1111/joim.12055.

LARIBI, B.; BETTAIEB, I.; KOUKI, K.; SAHLI, A.; MOUGOU, A.; MARZOUK, B; - **Water deficit effects on caraway (*Carum carvi* L.) growth, essential oil and fatty acid composition.** Ind. Crops Prod. 30:2009) 372–379.

LASS-FLÖRL, Cornelia - **The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe.** Mycoses. . ISSN 09337407. 52:3 (2009) 197–205. doi: 10.1111/j.1439-0507.2009.01691.x.

LOBO, V. *et al.* - **Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health.** Pharmacognosy Reviews. . ISSN 0973-7847. 4:8 (2010) 118. doi: 10.4103/0973-7847.70902.

MAHENDRA, P.; BISHT, S. - **Coriandrum sativum: a daily use spice with great medicinal effect.** Pharmacogn. J. 3:2011) 84–88.

MANACH, Claudine *et al.* - **Polyphenols - Food Sources and Bioavailability.pdf.** Am J Clin Nutr. . ISSN 00029165. 79:5 (2004) 727–47. doi: 10.1038/nature05488.

MARDH, Per-Anders *et al.* - **Facts and myths on recurrent vulvovaginal candidosis - a review on epidemiology , clinical manifestations , diagnosis , pathogenesis and therapy.** International Journal of STD & AIDS. . ISSN 0956-4624. 13:2002) 522–539. doi: 10.1258/095646202760159639.

MARONGIU, B. *et al.* - **Isolation of *Crithmum maritimum* L. volatile oil by supercritical carbon dioxide extraction and biological assays.** Natural Product Research. . ISSN 1478-6419. 21:13 (2007) 1145–1150. doi: 10.1080/14786410600911616.

MÁTHÉ, Athos - **Medicinal and Aromatic Plants of the World** [Em linha] Disponível em WWW:<URL:<http://link.springer.com/10.1007/978-94-017-9810-5>>. ISBN 978-94-017-9809-9.

MEDZHITOV, Ruslan - **Origin and physiological roles of inflammation.** Nature. . ISSN 14764687. 454:7203 (2008) 428–435. doi: 10.1038/nature07201.

MEOT-DUROS, Laetitia; FLOCH, Gaëtan Le; MAGNÉ, Christian - **Radical scavenging, antioxidant and antimicrobial activities of halophytic species.** Journal of Ethnopharmacology. . ISSN 03788741. 116:2 (2008) 258–262. doi: 10.1016/j.jep.2007.11.024.

MEOT-DUROS, Laetitia; MAGNÉ, Christian - **Antioxidant activity and phenol content of *Crithmum maritimum* L. leaves.** Plant Physiology and Biochemistry. . ISSN 09819428. 47:1 (2009) 37–41. doi: 10.1016/j.plaphy.2008.09.006.

MOLYNEUX, Philip - **The Use of the Stable Free Radical Diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity.** Songklanakarin Journal of Science and Technology. . ISSN 1047-7047. 26:December 2003 (2004) 211–219. doi: 10.1287/isre.6.2.144.

MORI, Masataka; GOTOH, Tomomi - **Regulation of nitric oxide production by arginine metabolic enzymes.** Biochemical and Biophysical Research Communications. . ISSN 0006291X. 275:3 (2000) 715–719. doi: 10.1006/bbrc.2000.3169.

- MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michael A. - **Medical microbiology**. ISBN 9780323299565.
- NABET, Nacim *et al.* - **Biological activities and secondary compound composition from *Crithmum maritimum* aerial parts**. *International Journal of Food Properties*. . ISSN 15322386. 20:8 (2017) 1843–1855. doi: 10.1080/10942912.2016.1222541.
- NGUIR, Asma *et al.* - **Chemical Composition , Antioxidant and Anti-acetylcholinesterase activities of Tunisian *Crithmum maritimum* L . Essential oils**. 1:4 (2011) 173–179.
- NIETO, Gema - **Biological Activities of Three Essential Oils of the Lamiaceae Family**. *Medicines*. . ISSN 2305-6320. 4:3 (2017) 63. doi: 10.3390/medicines4030063.
- NIKAIDO, Hiroshi - **Multidrug Resistance in Bacteria**. *Annual Review of Biochemistry*. . ISSN 0066-4154. 78:1 (2009) 119–146. doi: 10.1146/annurev.biochem.78.082907.145923.
- NIMSE, Satish Balasaheb; PAL, Dilipkumar - **Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms**. *RSC Adv*. . ISSN 2046-2069. 5:35 (2015) 27986–28006. doi: 10.1039/C4RA13315C.
- NOBILE, Clarissa J.; JOHNSON, Alexander D. - ***Candida albicans* biofilms and human disease**. *Annual Reviews in Microbiology*. 69:2015) 71–92. doi: 10.1146/annurev-micro-091014-104330.Candida.
- NORUM, KR. - **World Health Organization’s Global Strategy on diet, physical activity and health: the process behind the scenes**. *Scandinavian Journal Nutrition*. 49:2005) 83–88.
- OLIVEIRA, Hélder Da Silva; CARDOSO, Paulo Ribeiro - **Atitudes e hábitos de consumo de alimentos funcionais – um estudo exploratório**. 2010) 83–94.
- ORAV, A.; RAAL, A.; ARAK, Elma - **Essential oil composition of *Pimpinella anisum* L. fruits from various European countries**. *Nat. Prod. Res*. 22:2008) 227–232.
- OZCAN, M. *et al.* - **Essential oil composition of sea fennel (*Crithmum maritimum*) form Turkey**. *Nahrung*. 45:2001) 353–356. doi: 10.1002/1521-3803(20011001)45:5<353::AID-FOOD353>3.0.CO;2-4.
- PALMEIRA-DE-OLIVEIRA, A. *et al.* - **Anti-Candida Activity of Essential Oils**. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. . ISSN 13895575. 9:11 (2009) 1292–1305. doi: 10.2174/138955709789878150.
- PANDEY, N.; MEENA, R. P.; RAI, S. K.; PANDEY-RAI, S. - **Medicinal Plants Derived Nutraceuticals: a re-emerging health aid**. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 2:4 (2011) 419–441. doi: ISSN 0975-6299.
- PATEIRA, Leonor *et al.* - **Two chemotypes of *Crithmum maritimum* L. from Portugal**. *Flavour and Fragrance Journal*. . ISSN 08825734. 14:5 (1999) 333–343. doi: 10.1002/(SICI)1099-1026(199909/10)14:5<333::AID-FFJ839>3.0.CO;2-V.

PAVELA, Roman *et al.* - **Efficacy of sea fennel (*Crithmum maritimum* L., Apiaceae) essential oils against *Culex quinquefasciatus* Say and *Spodoptera littoralis* (Boisd.).** *Industrial Crops and Products.* . ISSN 09266690. 109:May (2017) 603–610. doi: 10.1016/j.indcrop.2017.09.013.

PAVLOVA, T.; STEPANICHEV, M.; GULYAEVA, N.; ALAVI, H.; HASSANZADEH, G.R.; BAYAT, M.; JAFARIAN, M.; KAZEMI, H.; GORJI, A. .. - **Pentylentetrazole kindling induces neuronal cyclin B1 expression in rat hippocampus.** *Neurosci. Lett.* 392:2006) 154–158.

PEREIRA, Catarina Guerreiro *et al.* - **Searching for new sources of innovative products for the food industry within halophyte aromatic plants: In vitro antioxidant activity and phenolic and mineral contents of infusions and decoctions of *Crithmum maritimum* L.** *Food and Chemical Toxicology.* . ISSN 02786915. 2017). doi: 10.1016/j.fct.2017.04.018.

PETROVSKA, Biljana Bauer - **Historical review of medicinal plants' usage.** *Pharmacognosy reviews.* . ISSN 0976-2787. 6:11 (2012) 1–5. doi: 10.4103/0973-7847.95849.

PFALLER, M. *et al.* - **Use of epidemiological cutoff values to examine 9-year trends in susceptibility of *Candida* species to anidulafungin, caspofungin, and micafungin.** *Journal of Clinical Microbiology.* . ISSN 00951137. 49:2 (2011) 624–629. doi: 10.1128/JCM.02120-10.

PFALLER, Michael A.; DIEKEMA, Daniel J. - **Epidemiology of invasive mycoses in North America.** ISBN 1040841090.

PFALLER, Michael A.; PAPPAS, Peter G.; WINGARD, John R. - **Invasive Fungal Pathogens : Current Epidemiological Trends.** 52242:Suppl 1 (2006) 3–14.

PHAM-HUY, Lien Ai; HE, Hua; PHAM-HUY, Chuong - **Free radicals, antioxidants in disease and health.** *International journal of biomedical science : IJBS.* . ISSN 1550-9702. 4:2 (2008) 89–96. doi: 10.1073/pnas.0804252105.

PINTO, Eugénia *et al.* - **Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species.** *Journal of Medical Microbiology.* . ISSN 00222615. 58:11 (2009) 1454–1462. doi: 10.1099/jmm.0.010538-0.

POETA, Maurizio DEL; CASADEVALL, Arturo - **Ten Challenges on *Cryptococcus* and *Cryptococcosis*.** *Mycopathologia.* . ISSN 0301486X. 173:5–6 (2012) 303–310. doi: 10.1007/s11046-011-9473-z.

PRAKASH, Bhanu *et al.* - **Assessment of some essential oils as food preservatives based on antifungal, antiaflatoxin, antioxidant activities and in vivo efficacy in food system.** *Food Research International.* . ISSN 09639969. 49:1 (2012) 201–208. doi: 10.1016/j.foodres.2012.08.020.

PRAKASH, Bhanu *et al.* - **Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities - Potentials and challenges.** *Food Control.* . ISSN 09567135. 47:2015) 381–391. doi: 10.1016/j.foodcont.2014.07.023.

- PROENÇA DA CUNHA, A. - **Farmacognosia e fitoquímica**. ISBN 9789723111422.
- PROENÇA DA CUNHA, A.; GASPAR, Natália; RODRIGUES ROQUE, Odete - **Cultura e Utilização das Plantas Medicinais e Aromáticas**. 2010).
- PROENÇA DA CUNHA, A.; NOGUEIRA, M. T.; ROQUE, O. R.; BARROSO, J. M. G. - **Plantas aromáticas e óleos essenciais: composição e aplicações**. 2012).
- RĂDULESCU, V.; POPESCU, M.L.; ILIEȘ, D. C. .. - **Chemical composition of the volatile oil from different plant parts of *Anethum graveolens* L. (Umbelliferae) cultivated in Romania**. *Farmacologia*. 58:2010) 594–599.
- RAJESHWARI, U.; ANDALLU, B. - **Medicinal benefits of coriander (*Coriandrum sativum* L.)**. *Spatula*. 1:2011) 51–58.
- RAMPERSAD, Sephra N. - **Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays**. *Sensors (Switzerland)*. . ISSN 14248220. 12:9 (2012) 12347–12360. doi: 10.3390/s120912347.
- RAUT, J. S. *et al.* - **Terpenoids of plant origin inhibit morphogenesis, adhesion, and biofilm formation by *Candida albicans***. *Biofouling*. . ISSN 10292454. 29:1 (2013) 37–41.
- RECIO, M. C.; ANDUJAR, I.; RIOS, J. L. - **Anti-Inflammatory Agents from Plants: Progress and Potential**. *Current Medicinal Chemistry*. . ISSN 09298673. 19:14 (2012) 2088–2103. doi: 10.2174/092986712800229069.
- RENNA, Massimiliano *et al.* - **Sea fennel (*Crithmum maritimum* L.): from underutilized crop to new dried product for food use**. *Genetic Resources and Crop Evolution*. . ISSN 15735109. 64:1 (2017) 205–216. doi: 10.1007/s10722-016-0472-2.
- RENNA, Massimiliano; GONNELLA, Maria - **The use of the sea fennel as a new spice-colorant in culinary preparations**. *International Journal of Gastronomy and Food Science*. . ISSN 18784518. 1:2 (2012) 111–115. doi: 10.1016/j.ijgfs.2013.06.004.
- REUTER, Simone *et al.* - **Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked?**. *Free Radical Biology and Medicine*. . ISSN 08915849. 49:11 (2010) 1603–1616. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006.
- RUBERTO, G. *et al.* - **Antioxidant and antimicrobial activity of *Foeniculum vulgare* and *Crithmum maritimum* essential oil**. *Planta Med*. 66:2000) 687–693. doi: 10.1055/s-2000-9773.
- RUHNKE, M.; HARTWIG, K.; KOFLA, G. - **New options for treatment of candidaemia in critically ill patients**. *Clin Microbiol Infect*. 14:2008) 46–54. doi: CLM1981 [pii]10.1111/j.1469-0691.2008.01981.x.
- SAHARKHIZ, Mohammad Jamal *et al.* - **Chemical Composition, Antifungal and Antibiofilm Activities of the Essential Oil of *Mentha piperita* L.** *ISRN Pharmaceutics*. . ISSN 2090-6153. 2012:2012) 1–6. doi: 10.5402/2012/718645.
- SANADA, Fumihiko *et al.* - **Source of Chronic Inflammation in Aging**. *Frontiers in*

- Cardiovascular Medicine. . ISSN 2297-055X. 5:February (2018) 1–5. doi: 10.3389/fcvm.2018.00012.
- SANGWAN, N.S., FAROOQI, A.H.A., SHABIH, F., SANGWAN, R. S. - **Regulation of essential oil production in plants**. Plant Growth Regul. . ISSN 01676903. 34:1 (2001) 3–21. doi: 10.1023/A:1013386921596.
- SAVILLE, Stephen P. *et al.* - **Inhibition of filamentation can be used to treat disseminated candidiasis**. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. . ISSN 00664804. 50:10 (2006) 3312–3316. doi: 10.1128/AAC.00628-06.
- SAYED-AHMAD, Bouchra *et al.* - **The Apiaceae: Ethnomedicinal family as source for industrial uses**. Industrial Crops and Products. . ISSN 09266690. 109:September (2017) 661–671. doi: 10.1016/j.indcrop.2017.09.027.
- SENATORE, F.; NAPOLITANO, F.; OZCAN, M. - **Composition and antibacterial activity of the essential oil from *Crithmum maritimum* L. (Apiaceae) growing wild in Turkey**. Flavour and Fragrance Journal. . ISSN 0882-5734. 15:3 (2000) 186–189. doi: 10.1002/1099-1026(200005/06)15:3<186::AID-FFJ889>3.3.CO;2-9.
- SHAHIDI, Fereidoon; NACZ, Marian - **Phenolics in Food and Nutraceuticals**. CRC Press. ISBN 978-0-50873-2 (2004).
- SHELEF, L. A. - **Herbs of the Umbelliferae**. Elsevier Science Ltd. 2003) 3090–3100.
- SINGER, Kanakadurga; LUMENG, Carey N. - **The initiation of metabolic inflammation in childhood obesity**. Journal of Clinical Investigation. . ISSN 15588238. 127:1 (2017) 65–73. doi: 10.1172/JCI88882.
- SIRACUSA, Laura *et al.* - **Phenolic composition and antioxidant activity of aqueous infusions from *Capparis spinosa* L. and *Crithmum maritimum* L. before and after submission to a two-step in vitro digestion model**. Journal of Agricultural and Food Chemistry. . ISSN 00218561. 59:23 (2011) 12453–12459. doi: 10.1021/jf203096q.
- SOLIMAN, H.A.; ELTABLAWY, N.A.; HAMED, M. S. - **The ameliorative effect of *Petroselinum crispum* (parsley) on some diabetes complications**. J. Med. Plants Stud. 3:2015) 92–100.
- SOWBHAGYA, H. B. - **Chemistry, technology, and nutraceutical functions of cumin (*Cuminum cyminum* L.): An Overview**. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 53:2013) 1–10.
- STANKOVIC, M.; NIKOLIC, N., STANOJEVIC, L.; CAKIC, M. .. - **The effect of hydrodistillation technique on the yield and composition of essential oil from the seed of *Petroselinum crispum* (mill.)**. Nym. Ex. A.W. Hill. Hem. Ind. 58:2004) 409–412.
- SVOBODA, K. P.; GREENAWAY, R. I. - **Investigation of volatile oil glands of *Satureja hortensis* L. (summer savory) and phytochemical comparison of different varieties**. International Journal of Aromatherapy. . ISSN 09624562. 13:4 (2003) 196–202. doi: 10.1016/S0962-4562(03)00038-9.

TAWEECHAI SUPAPONG, S. *et al.* - **Antibiofilm activity and post antifungal effect of lemongrass oil on clinical *Candida dubliniensis* isolate.** South African Journal of Botany. . ISSN 02546299. 78:2012) 37–43. doi: 10.1016/j.sajb.2011.04.003.

Food ingredient based on aquatic plants and method for producing it. TRAMIER, G; HELMLINGER, P. France patente FR26509411991,

TSAO, Rong - **Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols.** Nutrients. . ISSN 20726643. 2:12 (2010) 1231–1246. doi: 10.3390/nu2121231.

TSOUKATOU, MARIA; TSITSIMPIKOUB, CHRISTINA; VAGIAS, Constantinos;; VASSILIOS, Roussis - **Chemical Intra-Mediterranean Variation and Insecticidal Activity of *Crithmum maritimum*.** Z. Naturforsch. 56c:2001) 211–215.

UPPULURI, Priya; PIERCE, Christopher G.; LÓPEZ-RIBOT, José Luis - ***Candida albicans* biofilm formation and its clinical consequences.** Future Microbiology. 4:10 (2009) 1235–1237. doi: 10.1128/EC.00096-14.

VALE-SILVA, Luís *et al.* - **Correlation of the chemical composition of essential oils from *Origanum vulgare* subsp. *virens* with their in vitro activity against pathogenic yeasts and filamentous fungi.** Journal of Medical Microbiology. . ISSN 00222615. 61:2 (2012) 252–260. doi: 10.1099/jmm.0.036988-0.

VALENTE, J. *et al.* - **Antifungal, antioxidant and anti-inflammatory activities of *Oenanthe crocata* L. essential oil.** Food and Chemical Toxicology. . ISSN 02786915. 62:2013) 349–354. doi: 10.1016/j.fct.2013.08.083.

VALENTE, J. *et al.* - ***Margotia gummifera* essential oil as a source of anti-inflammatory drugs.** Industrial Crops and Products. . ISSN 09266690. 47:2013) 86–91. doi: 10.1016/j.indcrop.2013.02.036.

VALENTE, J. *et al.* - ***Margotia gummifera* essential oil as a source of anti-inflammatory drugs.** Industrial Crops and Products. . ISSN 09266690. 47:November (2013) 86–91. doi: 10.1016/j.indcrop.2013.02.036.

VALKO, Marian *et al.* - **Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.** International Journal of Biochemistry and Cell Biology. . ISSN 13572725. 39:1 (2007) 44–84. doi: 10.1016/j.biocel.2006.07.001.

VALLABHANENI, SNIGDHA; MODY, RAJAL K.; WALKER, TIFFANY; CHILLER, Tom - **The Global Burden of Fungal Diseases.** Infectious Disease Clinics of North America. . ISSN 15579824. 30:1 (2016) 1–11. doi: 10.1016/j.idc.2015.10.004.

VENTURINI, James *et al.* - **Dermatophyte-host relationship of a murine model of experimental invasive dermatophytosis.** Microbes and Infection. . ISSN 12864579. 14:13 (2012) 1144–1151. doi: 10.1016/j.micinf.2012.07.014.

VERMERRIS, Wilfred.; NICHOLSON, Ralph L. - **Phenolic compound biochemistry.** [S.l.] : Springer, (2006). ISBN 9781402051647.

WAKSMUNDZKA-HAJNOS, Monika; SHERMA, Joseph; KOWALSKA, Teresa - **Thin**

Layer Chromatography in Phytochemistry. [S.l.] : CRC Press, (2008). ISBN 9781420046779.

WAQAR, M. A.; SHAUKAT, S. - **Diabetes Mellitus - The Pertinent Exploration of Herbal Treatments_2006.pdf.** Journal of the Chemical Society of Pakistan. . ISSN 02535106. 28:4 (2006) 391–396.

WEITZMAN, I.; SUMMERBELL, R. C. - **The dermatophytes.** Clinical Microbiology Reviews. . ISSN 08938512. 8:2 (1995) 240–259.

ZARROUK, M; EL ALMI, H; BEN YOUSSEF, N; SLEIMI, N; SMAOUI, A; BEN MILED, D; ABDELLY, C; - Lipid composition of local halophytes seeds: *Cakile maritima*, *Zygophyllum album* and *Crithmum maritimum* . Em In: H. Lieth, & M. Moschenko. (Eds.), *Cash Crop Halophytes Recent Studies. Ten Years after the Al Ain Meeting.* Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers. 121-126 pp. p. 121–126.

ZUZARTE, Mónica *et al.* - **Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *lavandula viridis* P'he ´ r.** Journal of Medical Microbiology. . ISSN 00222615. 60:5 (2011) 612–618. doi: 10.1099/jmm.0.027748-0.

ZUZARTE, Monica R. *et al.* - **Mycotoxins Contamination in Food: Alternative Plant Preservatives, Legislation, and Detection Methods.** Handbook of Chemical and Biological Plant Analytical Methods. 2014). doi: 10.1002/9780470027318.a9945.

ZUZARTE, Mónica; SALGUEIRO, LÍgia - **Essential Oils Chemistry.** Bioactive Essential Oils and Cancer. 2015) 1–292. doi: 10.1007/978-3-319-19144-7.