

Vanessa Raquel Fonseca Rodrigues

Avaliação da atividade anti-inflamatória do óleo essencial de *Thymus zygis subsp. sylvestris* e dos seus compostos principais

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

Setembro de 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Capa: *Thymus zygis* subsp. *sylvestris* (adaptada de flora-on.pt)

Este trabalho teve o apoio da Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), União Europeia, Quadro de Referência Estratégico Nacional (QREN) e COMPETE para o financiamento da unidade de pesquisa CNC (project PEst-C/SAU/LA0001/2013-2014).



## **Agradecimentos**

Foram várias as pessoas que contribuíram para que este estudo se realiza-se da melhor forma possível. Desta forma quero mostrar a minha gratidão para com todos.

À professora Doutora Teresa Cruz e à professora Doutora Lígia Salgueiro, orientadoras deste projeto, pela oportunidade de trabalhar nesta área, pela ajuda e por se mostrarem sempre disponíveis.

À Doutora Célia Cabral, desde o início uma ajuda preciosa, o meu muito obrigado pelo apoio prestado nas partes experimentais, por toda a aprendizagem, disponibilidade, compreensão. Agradeço toda a paciência.

Ao professor Doutor Francisco Veiga por ter disponibilizado o Laboratório de Tecnologia Farmacêutica.

A todos os colegas de laboratório, que de alguma forma me ajudaram, em dúvidas que por vezes surgiam.

À Margarida e à Kaori pelo apoio e amizade.

Aos meus pais, avós, irmãos, ao Luís Carlos, à Liberta e toda a minha família por todo o carinho, compreensão nos momentos mais difíceis, e por sempre acreditaram em mim.

Aos meus amigos e a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos, muito obrigada!

# Índice

Índice .....	v
Índice de Figuras.....	vii
Índice de Tabelas.....	viii
Lista de Abreviaturas.....	ix
Resumo.....	xi
Abstract.....	xiii
<b>I- INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1. Plantas aromáticas e medicinais.....	2
2. Óleos essenciais .....	3
2.1. Características, composição e biossíntese.....	3
2.2. Métodos de extração.....	5
2.3. Importância Económica .....	7
2.4. Atividades biológicas.....	8
2.4.1. Atividade anti-inflamatória e antioxidante.....	9
3. Género <i>Thymus L</i> .....	11
3.1. <i>Thymus zygis L</i> .....	12
3.1.1. <i>Thymus zygis</i> subsp. <i>zygis</i> .....	12
3.1.2. <i>Thymus zygis</i> subsp. <i>sylvestris</i> .....	15
4. Composição do óleo essencial de <i>Thymus zygis</i> .....	18
5. Atividades biológicas do género <i>Thymus</i> .....	20
6. Objetivos.....	22
<b>II- MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
1. Materiais e métodos.....	24
1.1. Material vegetal .....	24
1.2. Isolamento e análise do óleo essencial .....	24
2. Avaliação da atividade anti-inflamatória .....	25
2.1. Culturas celulares e materiais.....	25

2.2. Produção de óxido nítrico (NO).....	25
3. Avaliação da citotoxicidade .....	26
3.1. Cultura celular e materiais .....	26
3.2. Determinação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT .....	27
4. Análise de dados.....	28
<b>III- RESULTADOS.....</b>	<b>29</b>
I. Produção de óxido nítrico.....	30
I.1. Efeito do óleo essencial e dos seus compostos principais na produção de óxido nítrico induzida por LPS em macrófagos (Raw 264.7).....	30
I.2. Efeito do óleo essencial e dos seus compostos principais na produção de óxido nítrico induzida por LPS em células de microglia (BV2).....	31
2. Avaliação da viabilidade celular .....	33
2.1. Efeito do óleo essencial e dos seus compostos principais na viabilidade celular de macrófagos (Raw 264.7) .....	33
2.2. Efeito do óleo essencial e dos seus compostos principais na viabilidade de microglia (BV2) .....	35
2.3. Efeito do óleo essencial e dos seus compostos principais na viabilidade de queratinócitos (HaCaT).....	36
2.4. Efeito do óleo essencial e dos seus compostos principais na viabilidade de hepatócitos (Hep G2) .....	38
2.5. Efeito do óleo essencial e dos seus compostos principais na viabilidade de células de epitélio alveolar (A549).....	39
<b>IV- DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....</b>	<b>41</b>
<b>V- TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>46</b>
<b>VI- BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>48</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> - Biossíntese dos compostos terpênicos .....	5
<b>Figura 2</b> - Aparelho de Clevenger .....	6
<b>Figura 3</b> - <i>T. zygis</i> subsp. <i>zygis</i> .....	13
<b>Figura 4</b> - <i>T. zygis</i> subsp. <i>zygis</i> : a) folha; b) inflorescência; c) flor; d) cálice.....	13
<b>Figura 5</b> - Ocorrência em Portugal de <i>T. zygis</i> subsp. <i>zygis</i> .....	14
<b>Figura 6</b> - <i>T. zygis</i> subsp. <i>sylvestris</i> .....	15
<b>Figura 7</b> - <i>T. zygis</i> subsp. <i>sylvestris</i> : j) hábito; k)folha; l) Inflorescência; m) flor n) cálice .....	16
<b>Figura 8</b> - Ocorrência em Portugal de <i>T. zygis</i> subsp. <i>sylvestris</i> .....	17
<b>Figura 9</b> - Efeito do óleo essencial de <i>T. zygis</i> subsp. <i>sylvestris</i> na inibição da produção de nitritos em macrófagos (Raw 264.7).....	30
<b>Figura 10</b> - Efeito do óleo essencial de <i>T. zygis</i> subsp. <i>sylvestris</i> na inibição da produção de nitritos em células da microglia (BV2).....	32
<b>Figura 11</b> - Efeito do óleo essencial de <i>T. zygis</i> subsp. <i>sylvestris</i> na viabilidade celular de macrófagos (ensaio do MTT).....	34
<b>Figura 12</b> - Efeito do óleo essencial de <i>T. zygis</i> subsp. <i>sylvestris</i> na viabilidade celular de microglia (BV2) (ensaio do MTT)..	35
<b>Figura 13</b> - Efeito do óleo essencial de <i>T. zygis</i> subsp. <i>sylvestris</i> na viabilidade celular de queratinócitos (HacaT) (ensaio do MTT).....	37
<b>Figura 14</b> - Efeito do óleo essencial de <i>T. zygis</i> subsp. <i>sylvestris</i> na viabilidade celular de hepatócitos (Hep G2) (ensaio do MTT)..	38
<b>Figura 15</b> - Efeito do óleo essencial de <i>T. zygis</i> subsp. <i>sylvestris</i> na viabilidade celular de células de epitélio alveolar (A549) (ensaio do MTT).....	40

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b> - Proveniência de <i>T. zygis</i> subsp. <i>sylvestris</i> , rendimento em óleo essencial e compostos principais. ....	24
<b>Tabela 2</b> - Efeito do óleo essencial e compostos principais de <i>T. zygis</i> subsp. <i>sylvestris</i> na inibição da produção de nitritos em macrófagos (Raw 264.7). ....	31
<b>Tabela 3</b> - Efeito do óleo essencial e compostos principais de <i>T. zygis</i> subsp. <i>sylvestris</i> na inibição da produção de nitritos em células de microglia (BV2). ....	33
<b>Tabela 4</b> - Efeito do óleo essencial e compostos principais de <i>T. zygis</i> subsp. <i>sylvestris</i> na viabilidade celular de macrófagos (Raw 264.7) (ensaio do MTT).....	34
<b>Tabela 5</b> - Efeito do óleo essencial e compostos principais de <i>T. zygis</i> subsp. <i>sylvestris</i> na viabilidade celular de microglia (BV2) (ensaio do MTT).....	36
<b>Tabela 6</b> - Efeito do óleo essencial e compostos principais de <i>T. zygis</i> subsp. <i>sylvestris</i> na viabilidade celular de queratinócitos (HacaT) (ensaio do MTT).....	37
<b>Tabela 7</b> - Efeito do óleo essencial e compostos principais de <i>T. zygis</i> subsp. <i>sylvestris</i> na viabilidade celular de hepatócitos (Hep G2) (ensaio do MTT).....	39
<b>Tabela 8</b> - Efeito do óleo essencial e compostos principais de <i>T. zygis</i> subsp. <i>sylvestris</i> na viabilidade celular de células de epitélio alveolar (A549) (ensaio do MTT).....	40



## Lista de Abreviaturas

CO<sub>2</sub>- Dióxido de carbono

COX-2- Ciclo-oxigenase-2

DMSO- Dimetil Sulfóxido

g- grama

h- horas

HCl- ácido clorídrico

H<sub>2</sub>O- água

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

IL- Interleucina (IL- $\alpha$ ; IL-6)

iNOS- isoforma indutível da sintase do óxido nítrico

LPS- Lipopolissacarídeo

mg- miligrama

mL- mililitro

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

M W 48- microplaca de 48 poços

NF-  $\kappa$ B - fator nuclear de transcrição *kappa B*

NO- óxido nítrico

°C- graus celsius

PBS- tampão fosfato salino

p/v- peso/volume

ROS- Espécies reativas de oxigênio

TNF- $\alpha$ - Fator de Necrose Tumoral alfa

Tzs- *Thymus zygis* subsp. *sylvestris*

$\mu\text{g}$ - micrograma

$\mu\text{L}$ - microlitro

v/v- volume/volume

## Resumo

O género *Thymus* L. é uma das plantas aromáticas e medicinais mais utilizadas em todo o mundo, fundamentalmente devido aos seus óleos essenciais. De facto, a procura de substâncias naturais biologicamente ativas tem encorajado a utilização de óleos essenciais por serem compostos de baixo peso molecular, biodegradáveis, capazes de atravessarem a barreira hemato-encefálica, normalmente isentos de toxicidade e com propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e microbicidas.

Várias espécies de *Thymus* são atualmente utilizadas em fitoterapia para a prevenção e tratamento de diversas doenças, nomeadamente do foro respiratório, gastrointestinal e sistema nervoso. Além disso, são utilizadas pelas suas características odoríferas, como condimento e na conservação de alimentos. Uma ampla gama de propriedades biológicas e terapêuticas foram relatados para este género.

Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito anti-inflamatório do óleo essencial do taxon *T. zygis* subsp. *sylvestris*, uma planta de uso reconhecido na área alimentar (condimentos).

O óleo essencial e os seus compostos principais (*p*-cimeno, timol e carvacrol), foram avaliados relativamente à sua atividade anti-inflamatória, utilizando ensaios *in vitro* realizados em linhas celulares preponderantes na resposta inflamatória periférica e central (macrófagos e microglia, respetivamente), analisando simultaneamente a toxicidade celular.

Os resultados dos testes efetuados na linha celular de macrófagos (Raw 264.7) evidenciaram a diminuição da produção do mediador pró-inflamatório óxido nítrico (NO) induzida pelo componente bacteriano lipopolissacarídeo (LPS). O efeito anti-inflamatório foi observado para concentrações do óleo isentas de citotoxicidade (0,64 e 0,32 µL/mL). Os compostos principais *p*-cimeno, timol e carvacrol evidenciaram uma diminuição da produção de NO para concentrações que simultaneamente apresentaram elevada citotoxicidade. Os resultados obtidos com o óleo essencial de *T. zygis* subsp. *sylvestris* em células de microglia (BV2) evidenciaram um decréscimo na produção de NO para todas as concentrações testadas apesar de apenas as concentrações de 0,16 e 0,08 µL/mL apresentaram um perfil seguro e isento de toxicidade. Estes resultados sugerem que o *T. zygis* subsp. *sylvestris* apresenta potencial terapêutico para o tratamento de doenças neurodegenerativas associadas a um estado pró-inflamatório mediado pela ativação da microglia. Os compostos principais timol e carvacrol apresentaram efeito anti-inflamatório para todas as concentrações testadas apesar de exibirem elevada citotoxicidade; o *p*-cimeno demonstrou uma boa atividade anti-inflamatória nas concentrações de 0,16 e 0,08 µL/mL.

Com o objetivo de avaliar o perfil de segurança toxicológica, o óleo essencial de *T. zygis* subsp. *sylvestris* e os seus compostos maioritários foram testados noutras linhas celulares humanas, nomeadamente queratinócitos (HacaT), hepatócitos (HepG2) e células de epitélio alveolar (A549).

O óleo essencial de *T. zygis* subsp. *sylvestris* não apresentou citotoxicidade nas linhas de queratinócitos, hepatócitos e epitélio alveolar nas concentrações de 0,16 e 0,08  $\mu\text{L/mL}$ . Os compostos maioritários timol e carvacrol apresentaram citotoxicidade nos tipos celulares referidos; o *p*-cimeno não demonstrou citotoxicidade nas concentrações de 0,16 e 0,08  $\mu\text{L/mL}$ .

Com este trabalho demonstrou-se que o óleo essencial de *T. zygis* subsp. *sylvestris* e um dos seus compostos, o *p*-cimeno representam uma fonte natural de novas moléculas anti-inflamatórias que poderão ser utilizadas em estratégias terapêuticas inovadoras no tratamento de patologias associadas a um componente inflamatório.

**Palavras-chave:** *Thymus zygis* subsp. *sylvestris*, óleo essencial, óxido nítrico, citotoxicidade, inflamação

## Abstract

The genus *Thymus* L. is one of the most aromatic and medicinal plants used worldwide, mainly due to its essential oils. In fact, the search for biologically active natural substances has encouraged the use of essential oils to be compounds of low molecular weight, biodegradable, capable of crossing the blood-brain barrier, normally free of toxicity and simultaneously presenting anti-inflammatory, antioxidant and microbicides properties.

Several species of *Thymus* are currently used in herbal medicine for the prevention and treatment of various diseases, including disorders of the respiratory, gastrointestinal and nervous system. Moreover, they are used by their scent features such as condiment and food preservation. A wide range of biological and therapeutic properties have been reported for this genus.

In this context, the present study aimed to evaluate the anti-inflammatory effect of the essential oil of the taxon *T. zygis* subsp. *sylvestris*, a plant recognized for use in the food area (condiments).

The essential oils and their major compounds (*p*-cymene, thymol and carvacrol) were evaluated for their anti-inflammatory activity using in vitro assays performed in cell lines prevalent in the peripheral and central inflammatory response (macrophages and microglia, respectively) while analyzing their cellular toxicity.

The results of the tests performed on the macrophage cell line (RAW 264.7) showed a decreased production of the pro-inflammatory mediator nitric oxide (NO) induced by the bacterial component lipopolysaccharide (LPS). The anti-inflammatory effect was observed for concentrations of the oil devoided of cytotoxicity (0.64 to 0.32  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ). The main compounds *p*-cymene thymol and carvacrol showed a decreased production of NO at concentrations that simultaneously exhibited high cytotoxicity. The results obtained from the essential oil of *T. zygis* subsp. *sylvestris* in microglial cells (BV2) showed a decrease in NO production for all concentrations tested, although only the concentrations of 0.16 to 0.08  $\mu\text{L}/\text{mL}$  had a safe toxicity profile. These results suggest that *T. zygis* subsp. *sylvestris* has therapeutic potential for the treatment of neurodegenerative diseases associated with a pro-inflammatory condition mediated by activation of microglia. The main compounds thymol and carvacrol showed anti-inflammatory effect at all concentrations tested although they exhibit high cytotoxicity; *p*-cymene showed good anti-inflammatory activity in concentrations of 0.16 to 0.08  $\mu\text{L}/\text{mL}$ .

Aiming to evaluate the toxicological safety profile of the essential oil of *T. zygis* subsp. *sylvestris* and its major compounds, their effects were also tested on other human cell lines, in particular keratinocytes (HaCaT), hepatocyte (HepG2) and alveolar epithelial cells (A549). The essential oil of *T. zygis* subsp. *sylvestris* showed no cytotoxicity in keratinocytes, hepatocytes and alveolar epithelium for the concentrations 0.16 and 0.08  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . The compounds thymol and carvacrol showed cytotoxicity in these cell types; *p*-cymene showed no cytotoxicity at the concentrations 0.16 and 0.08  $\mu\text{L}/\text{mL}$ .

Taken together, these results demonstrated that the essential oil of *T. zygis* subsp. *sylvestris* and *p*-cymene represent a natural source of new anti-inflammatory molecules, which can be used for innovative therapeutic strategies in the treatment of disorders presenting an inflammatory status.

**Keywords:** *Thymus zygis* subsp. *sylvestris*, essential oil, nitric oxide, cytotoxicity, inflammation



## **I-INTRODUÇÃO**

## I. Plantas aromáticas e medicinais

As plantas representam uma fonte importante de produtos bioativos para a Humanidade e o uso de produtos naturais com propriedades medicamentosas é tão antigo como a civilização humana. Por muito tempo, produtos minerais, vegetais e animais foram os únicos recursos para o alívio de enfermidades (Adams *et al.*, 2009; Proença da Cunha *et al.*, 2010; Rates, 2001).

Nas últimas décadas a ciência tem vindo a validar práticas de medicina tradicional e a reforçar esse conhecimento, pela identificação dos compostos ativos e dos respetivos mecanismos de ação (Proença da Cunha *et al.*, 2010). Com o aparecimento crescente de novas ameaças à saúde pública e dada a toxicidade associada ao uso indiscriminado de fármacos sintéticos tem havido um aumento de interesse pela utilização de plantas e produtos derivados de plantas (Elless *et al.*, 2000). Os produtos naturais e seus derivados estão na base do desenvolvimento de mais de 50% dos fármacos atualmente disponíveis, e as plantas contribuem com 25% desse total (Garcia & Solís, 2007; Gurib-Fakim, 2006).

Diversas áreas relacionadas com as plantas medicinais e outros produtos naturais são das que mais crescem a nível mundial (Ameh *et al.*, 2010), pelo que é muito importante impulsionar estudos nesta área.

As plantas produzem metabolitos primários, responsáveis pela produção de açúcares, lípidos, proteínas e ácidos nucleicos, que desempenham funções metabólicas essenciais nas plantas (Croteau *et al.*, 2000; Svoboda & Svoboda, 2000; Zwenger & Basu, 2008). Além disso produzem metabolitos secundários, que incluem uma grande diversidade de classes de compostos. Estes compostos desempenham importantes funções ecológicas de comunicação ou defesa, nomeadamente, em resposta a condições de *stresse*, a ataques de herbívoros e de diversos predadores, na atração de polinizadores e na prevenção de doenças, auxiliando, assim, a sobrevivência das espécies (Svoboda & Svoboda, 2000; Trapp & Croteau, 2001).

As plantas aromáticas e medicinais apresentam inúmeras potencialidades graças às diversas atividades biológicas conferidas pelos seus metabolitos. Os óleos essenciais são um exemplo de metabolitos produzidos com uma vasta utilização (Proença da Cunha *et al.*, 2012). Devido às suas diversas aplicações, os óleos essenciais são cada vez mais populares e interessantes a nível científico (Sadeghi *et al.*, 2013).



## 2. Óleos essenciais

### 2.1. Características, composição e biossíntese

O termo óleo essencial parece proceder da alquimia, praticada na Idade Média. A palavra óleo indica insolubilidade em água, e solubilidade em solventes orgânicos e gorduras (Proença da Cunha *et al.*, 2012; Simões *et al.*, 1999). O qualificativo “essencial” resulta do “destilado” ter sido considerado um produto ativo e essencial da planta (Morales, 1986).

Os óleos essenciais são normalmente misturas complexas e singulares de compostos voláteis aromáticos resultantes do metabolismo secundário das plantas (Bakkali *et al.*, 2008). São caracterizados pelo seu aspeto oleoso, por possuírem um forte odor, por serem raramente coloridos e, em geral, possuírem uma densidade menor que a da água (Miguel, 2010; Simões *et al.*, 1999).

Ocorrendo naturalmente nas plantas aromáticas, os óleos essenciais tornam estas espécies muito valiosas. As principais famílias produtoras de óleos essenciais são as *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Geraniaceae*, *Lamiaceae*, *Pinaceae*, *Rutaceae*, e *Verbenaceae* (Antunes *et al.*, 2004; Figueiredo *et al.*, 2007).

Extraídos a partir de diversos órgãos da planta (flores, folhas, sementes, cascas, madeira, frutos e raízes) (Proença da Cunha *et al.*, 2012), os óleos essenciais são produzidos maioritariamente em células secretoras, bolsas, canais, células epidérmicas ou tricomas glandulares (Bakkali *et al.*, 2008; Burt, 2004). Os óleos essenciais conferem importantes características às plantas que os produzem, sendo muito utilizados nas indústrias alimentar, cosmética e farmacêutica (Burt, 2004; Edris, 2007).

A composição e rendimento dos óleos essenciais nas plantas depende não só da diversidade genética mas também de outros fatores conhecidos por influenciar o seu rendimento e composição. Entre estes fatores estão, a evolução das espécies, variações fisiológicas, condições ambientais e variações geográfica (Figueiredo *et al.*, 2007).

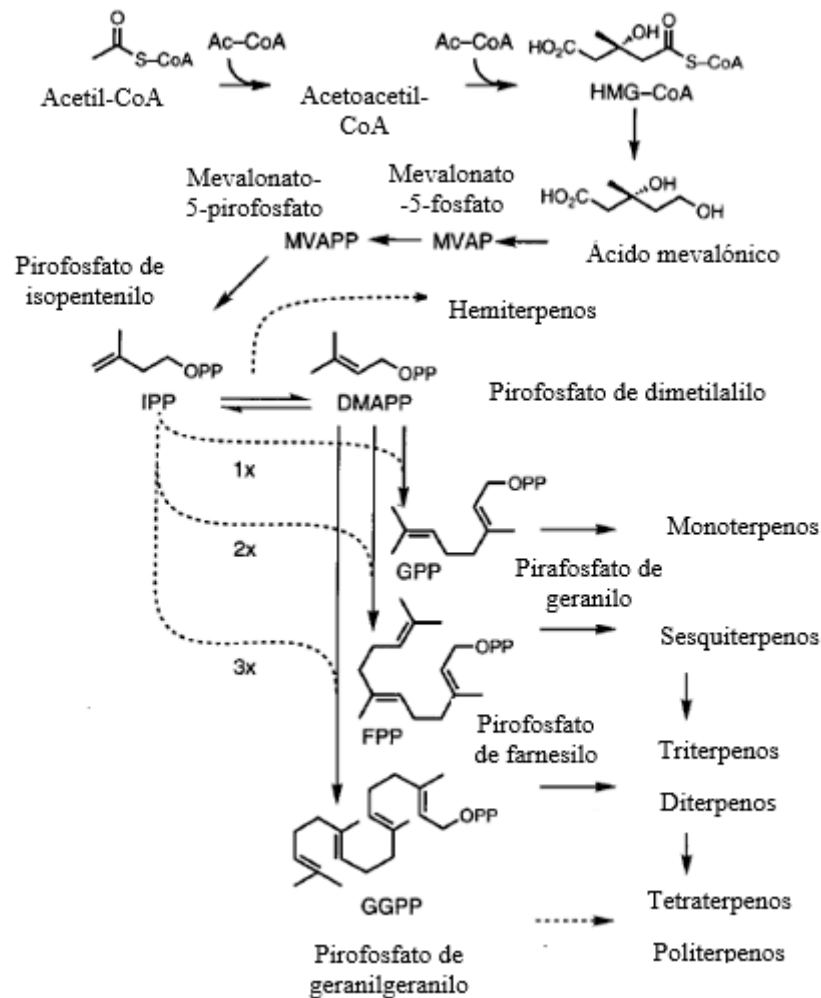
Constituídos, muitas vezes, por várias dezenas de compostos em diferentes concentrações, nos óleos essenciais predominam os compostos terpénicos e/ou fenilpropanóides (Tappin *et al.*, 2004). Biogeneticamente, os terpenóides e fenilpropanóides têm diferentes precursores metabólicos e são gerados por meio de diferentes vias biossintéticas. As vias envolvidas nos terpenóides são a do mevalonato e a via independente de mevalonato, enquanto que os fenilpropanóides são originados através da via do chiquimato (Dewick, 2002; Tolonen, 2003).

Frequentemente sujeitos a fatores abióticos, os compostos terpénicos voláteis são os mais frequentes nos óleos essenciais (Lima *et al.*, 2003), sendo os monoterpenos e

sesquiterpenos os que ocorrem com mais frequência nos óleos essenciais (Bakkali *et al.*, 2008). Estes são responsáveis pelas propriedades odoríferas, pelas características farmacológicas, relacionadas com a atividade da planta aromática de onde provem, e pelos produtos aromáticos industriais deles obtidos (Proença da Cunha *et al.*, 2012).

Os compostos terpénicos são a maior e mais diversificada família de produtos naturais (Croteau *et al.*, 2000), agrupando-se de acordo com a fusão sucessiva de unidades ramificadas em cinco carbonos (C5) com base no esqueleto de isopreno, podendo ser classificados em: hemiterpenos (C5) monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), sesterpenos (C25), triterpenos (C30), tetraterpenos (C40) e politerpenos (Dubey *et al.*, 2003). Os terpenos de baixo peso molecular que são frequentes nos óleos essenciais podem ser acíclicos, monocíclicos, bicíclicos e irregulares. Para além destes terpenos são também frequentes nos óleos essenciais fenilpropanóides e, por vezes ácidos orgânicos de baixo peso molecular (Simões *et al.*, 1999).

A biossíntese dos compostos terpénicos (Fig. 1) inicia-se com a condensação de dois compostos com cinco átomos de carbono, o pirofosfato de isopentenilo (PPI) e o seu isómero, o pirofosfato de dimetilalilo (PPDMA), que são produtos da via do acetato-mevalonato (McGarvey & Croteau, 1995; Proença da Cunha *et al.*, 2010). Esta condensação origina um composto intermediário em C10, o pirofosfato de geranilo, precursor imediato dos monoterpenos. O pirofosfato de geranilo, por sua vez, pode condensar com outra unidade de PPI e formar um novo intermediário em C15, o pirofosfato de farnesilo, precursor dos sesquiterpenos. Uma nova condensação do intermediário em C15 com o PPI vai originar o pirofosfato de geranilgeranilo, precursor dos diterpenos, terpenóides em C20, sendo estes últimos menos frequente nos óleos essenciais, principalmente nos que são isolados por destilação (McGarvey & Croteau, 1995; Proença da Cunha *et al.*, 2010).



**Figura 1** - Biossíntese dos compostos terpênicos

Fonte: Adaptado de McGarvey & Croteau, 1995.

## 2.2. Métodos de extração

O termo “óleo essencial” está definido para os produtos que se obtêm exclusivamente por destilação da matéria vegetal, com ou sem vapor de água, ou por processos mecânicos, a partir do epicarpo de frutos de espécies do gênero *Citrus*. A destilação e a expressão são os processos de obtenção industrial de óleos essenciais (Baser & Demirci, 2007; Figueiredo, *et al.*, 2007; Miguel, 2010; Proença da Cunha *et al.*, 2007).

A destilação proporciona a extração dos compostos voláteis sem arrastamento de produtos fixos, utilizando água e/ou o vapor de água para facilitar a libertação dos óleos essenciais das células ou das estruturas vegetais onde se acumulam. O vapor de água arrasta os compostos voláteis que, após condensação, vão constituir uma fase oleosa imiscível com a água, o óleo essencial. Existem três tipos de técnicas de destilação: a hidrodestilação, a destilação em água com arrastamento de vapor e a destilação por arrastamento de vapor. A hidrodestilação é a técnica usada pela maioria dos investigadores e também pelas indústrias

de menores dimensões, por requerer destiladores mais simples (Proença da Cunha *et al.*, 2010). Esta técnica tem a vantagem de apenas arrastar substâncias voláteis, de ser simples e barata (Lawrence, 1995). A determinação do teor em óleos essenciais é efetuado num aparelho especial (aparelho de Clevenger modificado (Fig.2), de acordo com o procedimento descrito na Farmacopeia Portuguesa, 2005.



**Figura 2** - Aparelho de Clevenger

### 2.3. Importância Económica

A nível mundial, o valor económico das plantas aromáticas, reflete-se particularmente sobre os óleos essenciais deles obtidos. A terapêutica, principalmente a nível da fitoterapia, usa um grande número de plantas aromáticas nos cuidados primários de saúde (Proença da Cunha et al., 2010).

Os óleos essenciais tem diversas utilizações na indústria alimentar e de bebidas, como aditivos naturais, para melhorar certas características dos alimentos. São também utilizados na indústria de perfumes, de saboaria e de cosméticos, pois encontram nos óleos essenciais os aromas que valorizam o seu produto. De uso mais recente e restrito encontra-se a utilização de óleos essenciais na indústria de alimentos compostos para animais, onde são incluídos, como aromatizantes, contribuindo para a aceitabilidade do alimento composto, quer como modificadores de funções fisiológicas. Na agricultura os óleos essenciais são utilizados, como repelentes de insetos, inseticidas ou moluscicidas. Em Farmácia, são cada vez mais utilizados como adjuvantes corretivos de sabor e odor em medicamentos destinados à administração por via oral, ou ainda como aromatizantes em medicamentos para a aplicação sobre a pele e mucosas (Proença da Cunha et al., 2010).

O conhecimento prévio das condições de cultivo é fundamental, para garantir o aumento ou manutenção do rendimento e da produção dos componentes dos óleos essenciais de importância económica reconhecida. O valor de mercado do óleo essencial é determinado pela sua qualidade, que depende diretamente da composição, maioritariamente rica em terpenos. A identificação de quimiotipos deve ser considerado, sendo muito importante para a manutenção da qualidade, planeamento de cultivos e obtenção de fitofármacos (Lima et al., 2003).

Estima-se que a produção mundial dos óleos essenciais seja superior a 42.000 toneladas (Figueiredo et al. 2007), sendo que uma grande parte provém de plantas espontâneas. Esta situação tem consequências negativas, como a ameaça de algumas populações e habitats de plantas medicinais e aromáticas, uma vez que a colheita nem sempre é feita de forma sustentável, e algumas espécies são endemismos, por vezes com nichos ecológicos muito vulneráveis (Figueiredo et al., 2007). Assim, a cultura de plantas aromáticas e medicinais deve ser incentivada e processada de acordo com as boas práticas de cultura, colheita e conservação para que se possam obter produtos finais de qualidade.

## 2.4. Atividades biológicas

O uso de plantas medicinais, ou extratos dos mesmos, tem sido tradicionalmente praticado em todo o mundo na prevenção e tratamento de diversas doenças crônicas, nomeadamente doenças cardiovasculares, inflamatórias, intestinais, artrite, diabetes, alergias, esclerose múltipla e ainda doenças neurodegenerativas, como Parkinson e Alzheimer (Juhás *et al.*, 2008).

As plantas aromáticas e medicinais, nomeadamente os seus óleos essenciais, apresentam inúmeras potencialidades, e são diversas as atividades biológicas que lhes são atribuídas, tais como: antioxidantes, bactericidas, fungicidas, antivirais, antiparasitárias, inseticidas, anti-inflamatórias, sendo a atividade antioxidante e anti-inflamatória de grande interesse para as indústrias alimentar, cosmética e farmacêutica (Bakkali *et al.*, 2008; Edris, 2007; Inouye *et al.*, 2001; Miguel, 2010; Zuzarte *et al.*, 2011). Os óleos essenciais e seus constituintes aplicam-se a nível da saúde humana e animal, pelas suas propriedades com interesse terapêutico, resultantes da ação de algum dos seus múltiplos constituintes ou sinergismos entres vários deles (Proença da Cunha *et al.*, 2010). Com efeito, muitas vezes a bioatividade dos óleos essenciais é devida, não apenas a um componente, mas sim à ação combinada dos seus diversos constituintes.

A atividade antimicrobiana é uma das mais estudadas e reportada para os óleos essenciais. Esta atividade está, geralmente, associada à presença de pequenas moléculas oxigenadas, capazes de estabelecer pontes de hidrogénio, exemplos do timol, do carvacrol, do eugenol, do linalol, do geraniol, ou do geranial. Geralmente atuam por modificações da membrana externa dos microrganismos e por inibição de enzimas da cadeia respiratória, comprometendo o equilíbrio energético da célula (Proença da Cunha *et al.*, 2012).

A eficácia na inibição do desenvolvimento de bactérias *Gram positivas* e *Gram negativas*, de leveduras e fungos filamentosos, incluindo por vezes estirpes usualmente resistentes aos antibióticos convencionais, por alguns óleos de algumas espécies (exemplo de *Foeniculum vulgare*, *Mentha piperita*, *Thymus vulgaris*) tem motivado o interesse para a avaliação e caracterização da atividade antimicrobiana de óleos essenciais (Cowan, 1999).

Reichling *et al.*, (2009) compilou os resultados mais importantes sobre as propriedades antibacterianas e antivirais de óleos essenciais publicados na última década. Nesta revisão, os óleos essenciais mostraram-se eficazes contra bactérias do trato respiratório. Além disso, os óleos essenciais também revelaram ser eficientes na inibição do

crescimento e redução do número de outras bactérias altamente patogénicas, tais como *Salmonella* spp, *E. coli* O157:H7 e *Listeria monocytogenes* (Burt, 2004).

Muitas plantas aromáticas usadas na medicina tradicional nunca foram caracterizadas relativamente à sua composição química nem sujeitas a avaliações científicas das suas atividades biológicas, pelo que se torna crucial investir nesta área de conhecimento de modo a que essas plantas possam ser utilizadas tendo por base critérios de qualidade, eficácia e segurança.

#### **2.4.1. Atividade anti-inflamatória e antioxidante**

A inflamação é uma resposta biológica complexa do hospedeiro contra agentes agressivos, tais como agentes patogénicos, irritantes, ou células danificadas. Pode ser classificada como aguda ou crónica e envolve uma cascata de eventos bioquímicos que constituem o sistema vascular local, o sistema imunológico, e diferentes tipos de células encontradas no tecido lesionado. A inflamação aguda é a resposta inicial e é caracterizada pelo recrutamento e ativação de células do sistema imune inato, tais como neutrófilos e monócitos, do sangue para os tecidos lesionados. A inflamação crónica, por sua vez, refere-se a uma mudança progressiva no tipo de células presentes no local da reação inflamatória e caracteriza-se pela destruição e posterior cicatrização do tecido lesionado (Ferrero-Miliani et al., 2007).

Independentemente do fator desencadeante, os mecanismos envolvidos no processo inflamatório são comuns a todos os sinais padrão e de inflamação, e são expressos por um aumento do fluxo de sangue, elevado metabolismo celular, vasodilatação, libertação de mediadores solúveis, extravasamento de fluidos e influxo celular (Ferrero-Miliani et al., 2007).

O fator de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) é altamente ativo em locais de inflamação em diversas patologias e pode induzir a transcrição de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, isoforma indutível da sintase do óxido nítrico (iNOS) e cicloxigenase-2 (COX-2) (Tak & Firestein, 2001).

O aumento da expressão de diversas citocinas, tais como o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), interleucina (IL)-1 $\beta$  e IL-6, facilitam a migração de leucócitos para o local da inflamação. A produção destas citocinas pró-inflamatórias pode ser induzida por lipopolissacarídeo (LPS), que está localizada na parede celular de bactérias *Gram-negativas*, capazes de ativar macrófagos que libertam mediadores inflamatórios, incluído o óxido nítrico (NO), exercendo funções regulatórias a fim de restaurar a homeostase do tecido (Silveira e Sá et al., 2014).

As doenças neurodegenerativas (por exemplo, doença de Alzheimer e doença de Parkinson) envolvem respostas neuro-inflamatórias mediadas pela microglia, que podem ser ativadas por fatores endógenos e estímulos ambientais, tais como LPS, levando à ativação de fatores de transcrição, nomeadamente o NF- $\kappa$ B e como consequência, à expressão de genes pró-inflamatórios (Silveira e Sá *et al.*, 2014).

Neste sentido a utilização de fármacos anti-inflamatórios constitui uma ferramenta eficaz na prevenção ou tratamento de doenças associadas a um componente inflamatório. Neste contexto, as plantas medicinais e seus metabolitos são muito utilizados na medicina popular para o tratamento de diferentes condições inflamatórias (Silveira e Sá *et al.*, 2013). A título de exemplo referem-se os óleos essenciais do eucalipto, rosmaninho, lavanda, milefólio, juntamente com outras plantas (pinho, cravo e mirra) que têm sido utilizados em formulações mistas como agentes anti-inflamatórios (Darshan & Doreswamy, 2004). O óleo essencial de camomila foi utilizado durante séculos como um anti-inflamatório e também para aliviar os sintomas associados ao eczema, dermatite e outras irritações cutâneas (Kamatou & Viljoen, 2010).

A atividade antioxidante dos óleos essenciais é também uma das suas atividades biológicas de grande interesse, uma vez que os óleos essenciais podem ser úteis na preservação de alimentos contra os efeitos tóxicos dos oxidantes (Maestri *et al.*, 2006). Além disso, os óleos essenciais são também competentes na eliminação de radicais livres, desempenhando um papel importante na prevenção de doenças, tais como, a disfunção cerebral, cancro, doenças do coração e o declínio do sistema imunológico. Evidências científicas crescentes sugerem que estas patologias podem resultar de danos celulares causados pelos radicais livres (Aruoma, 1998; Kamatou & Viljoen, 2010).

Se os óleos essenciais são capazes de eliminar alguns radicais livres, eles também podem atuar como agentes anti-inflamatórios, uma vez que a resposta inflamatória está associada ao poder oxidativo que ocorre em diversas células (monócitos, neutrófilos, eosinófilos e macrófagos). A atividade anti-inflamatória dos óleos essenciais pode ser atribuída não apenas à sua atividade antioxidante, mas também às suas interações com cascatas de sinalização intracelular que envolvem a ativação de fatores de transcrição com consequente aumento da expressão de genes pró-inflamatórios, nomeadamente citocinas (Miguel, 2010).

Na busca contínua de novos produtos naturais anti-inflamatórios, os óleos essenciais e os seus compostos isolados são cada vez mais referidos como uma fonte rica em tais compostos bioativos (Silveira e Sá *et al.*, 2013).



### 3. Género *Thymus* L.

A designação tomilho inclui as plantas pertencentes ao género *Thymus* L. e ainda a espécie *Thymbra capitata* (L.) Cav., que alguns autores incluíram em *Thymus*, pela sua semelhança com as plantas deste género (Salgueiro, 1994). De acordo com a Farmacopeia Portuguesa o fármaco tomilho é constituído pelas folhas inteiras, destacadas dos ramos, previamente secos, de *Thymus vulgaris* L., ou de *T. zygis* Loefl. ex L., ou a mistura das duas espécies (Proença da Cunha et al., 2010).

Os tomilhos (*Thymus* sp.), pertencem à família Lamiaceae. Esta família consiste em aproximadamente 3500 espécies que são nativas principalmente na área do Mediterrâneo, embora algumas tenham origem na Austrália, no Sudoeste da Ásia e na América do Sul (Mariutti & Bragagnol, 2007). São ainda exemplos desta família as espécies de alecrim (*Rosmarinus* sp.), sálvia (*Salvia* sp.), oregão (*Origanum* sp.), manjeriço (*Ocimum* sp.), manjerona (*Marjorana* sp.), menta (*Mentha* sp.), segurelha (*Satureja* sp.), entre outras, as quais têm sido estudadas particularmente devido às suas propriedades biológicas (Naghbi et al. 2005). Na família das Labiadas ou Lamiaceae, o óleo essencial predomina nas partes aéreas floridas da planta (Proença da Cunha et al., 2007).

De acordo com (Morales, 1986), que estudou o género *Thymus* na Península Ibérica, considera-se sete secções no género *Thymus*, ocorrendo em Portugal apenas cinco: sect. *Mastichina* (Mill.) Benth., sect. *Micantes* Velen., sect. *Pseudothymbra* Benth., sect. *Thymus* subsect. *Thymus*, sect. *Thymus* subsect. *Thymastra* R. Morales, sect. *Serpyllum* (Mill.) Benth. subsect. *Alternantes* klofer, sect. *Serpyllum* subsect. *Pseudomarginari* (H. Braun & Borbás) Jalas.

Das onze espécies que ocorrem em Portugal algumas apresentam polimorfismo morfológico, sendo possível considerar nessas espécies taxa infra-específicos com áreas fitogeográficas diferentes. Assim, consideram-se no total catorze taxa portuguesas: *T. mastichina* (L.) L. subsp. *mastichina*; *T. mastichina* (L.) L. subsp. *donyanae* R. Morales; *T. albicans* Hoffmanns & Link; *T. caespititius* Brot; *T. lotocephalus* G. López & R. Morales; *T. villosus* L. subsp. *villosus*; *T. villosus* L. subsp. *lusitanicus* (Boiss.) Coutinho; *T. carnosus* Boiss; *T. zygis* Loefl. ex L. subsp. *zygis*, *T. zygis* Loefl. ex L. subsp. *sylvestris* (Hoffmanns. & Link) Brot. ex Coutinho; *T. capitellatus* Hoffmanns. & Link; *T. camphoratus* Hoffmanns. & Link; *T. pulegioides* L.; *T. praecox* Opiz subsp. *ligusticus* ( Briq.) Paiva & Salgueiro. Deste último táxon só se conhece material da colheita original (Salgueiro, 2007).

### 3.1. *Thymus zygis* L.

Subarbusto até 30 cm, ereto ou prostrado e radicante. Caules eretos ou ascendentes. Folhas 4,5-10x0,5-1mm, lineares, com margem revoluta, ciladas na base, esparsamente pubescentes na página superior, pubescentes na inferior. Inflorescências espiciformes com verticilastros afastados, os apicais por vezes mais aproximados. Brácteas 4,5-10x0,7-1,2 mm; semelhantes às folhas. Cálice 2,5-5mm longo; tubo pubescente; dentes superiores tão compridos como largos, não cilados. Corola até 6 mm longa, esbranquiçada a rosada; lábio superior ± emarginado (Salgueiro, 1994).

*T. zygis* vegeta nos países ao redor do Mar Mediterrâneo e é muito bem difundido em Portugal e Espanha. Este taxon apresenta 3 subespécies (Morales, 1986).

Em Portugal Continental, apresentando duas subespécies a *zygis* e a *sylvestris* (Hoffmanns & Link) Brot. Ex Coutinho (Proença da Cunha, et al., 2011). Em Espanha em vez da subespécie *zygis*, é possível encontrar a subespécie *gracillis* (Morales, 1986). Este trabalho concentra-se no estudo da espécie *T. zygis* subsp. *sylvestris*.

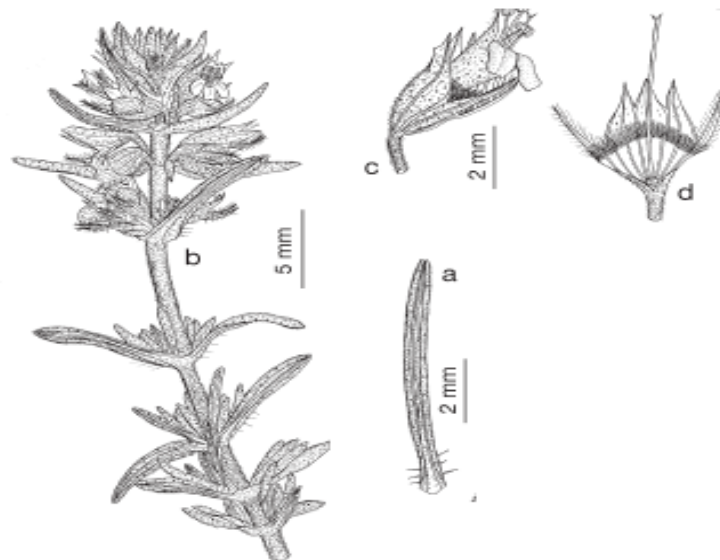
#### 3.1.1. *Thymus zygis* subsp. *zygis*

*T. zygis* subsp. *zygis* (Fig. 3), conhecido vulgarmente por serpão-do-monte, tomilhinha, é um subarbusto até 20 cm, ± decumbente ou radicante; esparsamente pubescente, com pelos curtos, <0,2 mm longos. Folhas 5,5-8,5x0,5-1mm. Cálice 3-4 mm longos; tubo 1,5-2 mm, pubescente. Corola até 4 mm longa, branca ou creme (Fig. 4) (Morales, et al., 2010; Salgueiro, 1994).

Desenvolve-se bem sobre calcários, margas, granitos. Areias, serpentinitos e xistos, formando por vezes grandes manchas. Este taxon suporta bem as baixas temperaturas, mas tem menor resistência à seca que a subespécie *sylvestris*. Floresce normalmente de Maio a Julho. É um endemismo das regiões interiores do Norte da Península Ibérica. Em Portugal, está muito bem difundido em Trás-os-Montes (Fig. 5), onde forma amplas manchas (Salgueiro, 1994).



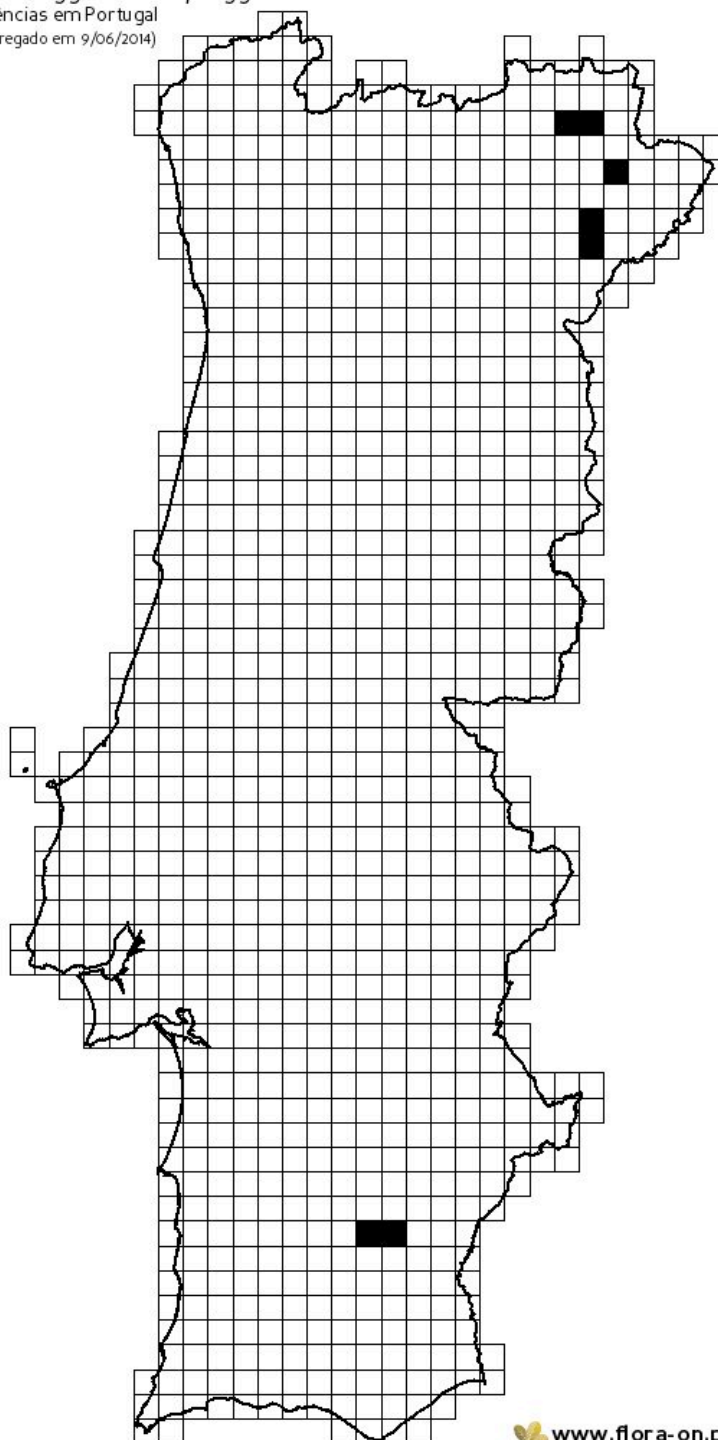
**Figura 3** - *T. zygis* subsp. *zygis* (adaptada de flora-on.pt)



**Figura 4** - *T. zygis* subsp. *zygis*: a) folha; b) inflorescência; c) flor; d) cálice  
(adaptado de Morales, et al., 2010)

*Thymus zygis* L. subsp. *zygis*ocorrências em Portugal  
(descarregado em 9/06/2014)

Dados: A.J.Pereira, M.Porto, J.Loureiro, C.Aguiar, J.D.Almeida  
A informação contida neste mapa é alvo de actualizações frequentes, podendo estar incompleta  
Quadric. da UTM. UTM Datum WG 384

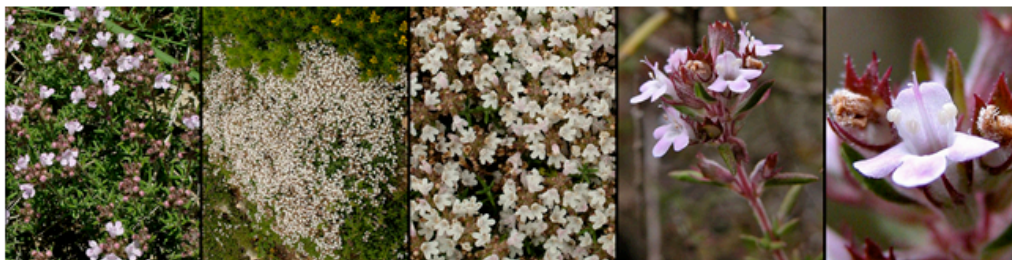
 [www.flora-on.pt](http://www.flora-on.pt)

**Figura 5** - Ocorrência em Portugal de *T. zygis* subsp. *zygis*

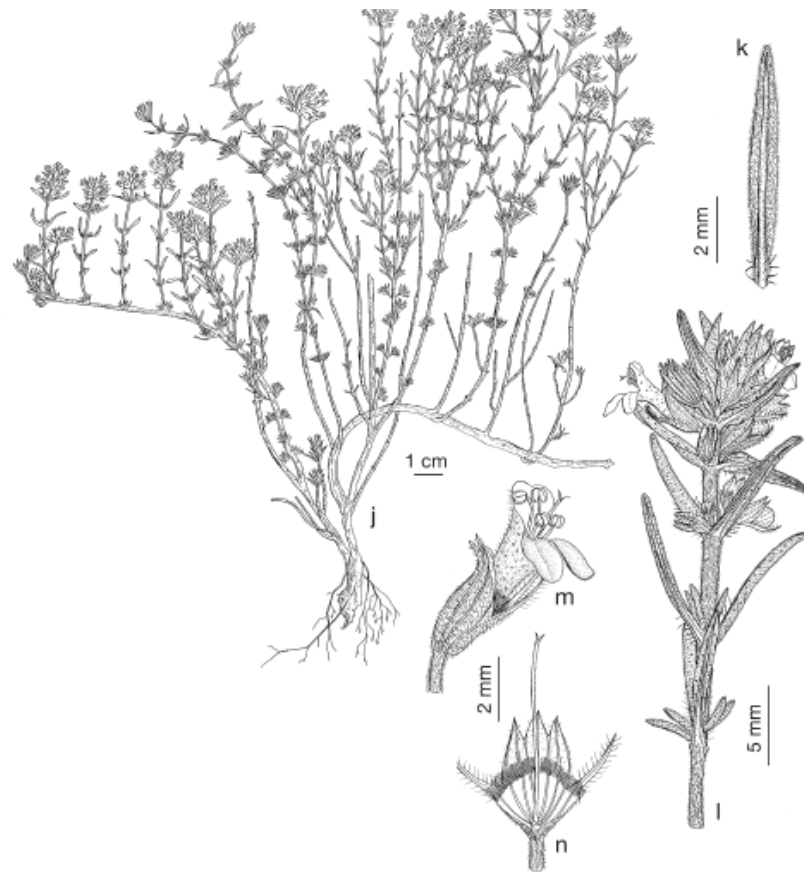
### 3.1.2. *Thymus zygis* subsp. *sylvestris*

*T. zygis* subsp. *sylvestris* (Fig.6), conhecido vulgarmente por erva-de-Santa-Maria, marganiça, margacinha, sargacinha, erva-santa, erva-das-azeitonas, serpão, tomilho-branco. É um subarbusto até 25-30 cm. Caules eretos ou radicantes, densamente pubescentes, normalmente com pêlos > 0,2mm longos. Folhas 6-9x0,6-1mm. Cálice 3,5-5,5 mm longo; tubo com 2 mm longo, pubescente. Corola 4-6 mm longa; branca ou rosada (Fig.7) (Morales *et al.*, 2010; Salgueiro, 1994).

Planta preferencialmente basófila, encontrando-se predominantemente sobre calcários, em sítios secos, descampados e pedregosos. Floresce normalmente de Abril a Junho. É um endemismo da região centro e sul da Península ibérica. Em Portugal encontra-se muito bem distribuída na zona centro, formando grandes manchas (Fig.8). Esta subespécie é muito difícil de distinguir morfológicamente da subespécie *zygis* (Salgueiro, 1994).



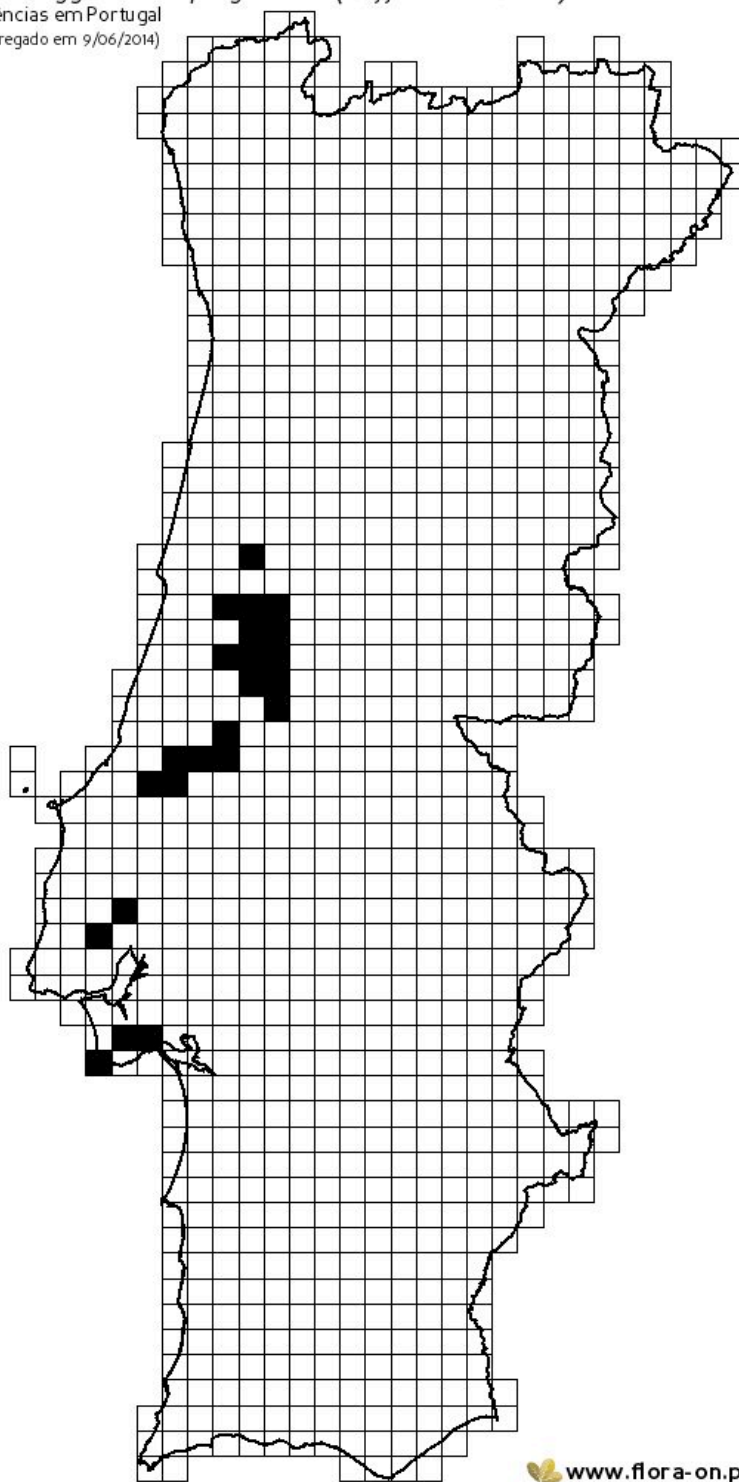
**Figura 6** - *T. zygis* subsp. *sylvestris*. (adaptada de flora-on.pt)



**Figura 7** - *T. zygis* subsp. *sylvestris* : j) hábito; k) folha; l) Inflorescência; m) flor; n) cálice  
(adaptado de Morales, et al., 2010)

*Thymus zygis* L. subsp. *sylvestris* (Hoffmanns. & Link) Cout.  
ocorrências em Portugal  
(descarregado em 9/06/2014)

Dados: P.V.Araújo, A.Carapeto, F.Clamote, J.D.Almeida, M.Porto, E.Marabuto, A.J.Pereira, A.Francisco  
A informação contida neste mapa é alvo de actualizações frequentes, podendo estar incompleta  
Quadric. UTM 10km Datum WGS84



 [www.flora-on.pt](http://www.flora-on.pt)

**Figura 8** - Ocorrência em Portugal de *T. zygis* subsp. *sylvestris*

#### 4. Composição do óleo essencial de *Thymus zygis*

A identificação dos constituintes dos óleos essenciais é importante para a compreensão e previsão dos respetivos efeitos fisiológicos. Por exemplo, os óleos essenciais ricos em hidrocarbonetos sesquiterpénicos exibem, frequentemente, efeito anti-inflamatório (Tappin *et al.*, 2004).

Os resultados do estudo de um elevado número de amostras individuais de *T. zygis* subsp. *zygis* evidenciaram uma acentuada variabilidade infra-específica no seio das populações (Salgueiro, 1994), tendo sido possível caracterizar quatro quimiotipos: timol, carvacrol, acetato de geranilo/ geraniol e acetato de geranilo/ geraniol/ timol. Nos quimiotipos fenólicos, o *p*-cimeno e o  $\gamma$ -terpineno, precursores de timol e de carvacrol, estão sempre presentes em teores significativos (Salgueiro, 2007).

De modo geral, estes resultados estão concordantes com os obtidos por outros investigadores com plantas espanholas, com exceção do quimiotipo linalol que apenas foi assinalado em Espanha (Sáez, 1995). Em Portugal este quimiotipo é específico da subespécie *sylvestris*. Por outro lado, as populações espanholas que tem óleo essencial do tipo fenólico apresentam, normalmente, teores mais elevados de timol e/ou carvacrol do que as portuguesas do mesmo tipo (Salgueiro, 1994).

O *T. zygis* subsp. *sylvestris* é muito difícil de distinguir quimicamente da subespécie *zygis*. Assim, apresenta os seguintes quimiotipos: timol, carvacrol, acetato de geranilo/ geraniol como a subespécie tipo, distinguindo-se desta apenas pelos quimiotipos ricos em linalol e em 1,8-cineol, que podem ser considerados específicos da subespécie *sylvestris* (Salgueiro, 1994).

O quadro I apresenta o resumo dos principais trabalhos realizados sobre a composição do óleo de *T. zygis*, destacando os compostos maioritários identificados, podendo-se verificar que o *T. zygis*, assim como de um modo geral muitos outros tomilhos, é um taxon com polimorfismo químico, que se traduz em diversos quimiotipos. Ou seja, a mesma espécie pode apresentar composição química diferente, sobretudo a nível quantitativo, independentemente das condições ambientais e edáficas, estando relacionado fundamentalmente com a parte genética da planta (Salgueiro, 1994). Assim, é muito importante haver um controlo da planta em relação à composição do seu óleo essencial, pois algumas não satisfazem o teor de fenóis exigido pelas Farmacopeias e as suas normas nacionais e internacionais (Proença da Cunha *et al.*, 2012).



Quadro I- Revisão bibliográfica

Origem	Taxon	Compostos principais
(Salgueiro, 1994), Portugal	<i>T. zygis</i> subsp. <i>zygis</i>	<i>p</i> -cimeno (5-30%), carvacrol (0,3-41%), timol (0,2-34%), $\gamma$ -terpineno (1-24%), acetato de geranil (0,1-44%), geraniol (0,1-25%).
	<i>T. zygis</i> subsp. <i>sylvestris</i>	timol (4-25%), carvacrol (1-23%), <i>p</i> -cimeno (10-22%), $\gamma$ -terpineno (4-17%), linalool (3-30%), acetato de geraniol t-(21%), geraniol t-(21%), 1,8-cineol (12%).
(Sáez, 1995), Espanha	<i>T. zygis</i> subsp. <i>sylvestris</i>	timol e linalol.
	<i>T. zygis</i> subsp. <i>gracillis</i>	timol.
(Moldão-Martins et al., 1999), Portugal	<i>T. zygis</i> subsp. <i>sylvestris</i>	timol (21%), acetato de geranilo (17%), geraniol (13%) e presença de <i>p</i> -cimeno.
(Moldão-Martins et al., 2000), Portugal	<i>T. zygis</i> subsp. <i>sylvestris</i>	Hidrocarbonetos monoterpênicos (29%), fenóis terpênicos (22%), álcoois terpênicos (21%), ésteres terpênicos (19%), sesquiterpenos (5%).
(Pina-Vaz et al., 2004), Portugal	<i>T. zygis</i> subsp. <i>zygis</i>	timol (39,6) e <i>p</i> -cimeno (21,2%).
(Martínez et al., 2006), Espanha	<i>T. zygis</i> subsp. <i>gracillis</i>	timol (62,1%), <i>p</i> -cimeno (17,03%).
(Rota et al., 2008), Espanha	<i>T. zygis</i> subsp. <i>gracillis</i>	timol (68,1%) , <i>p</i> -cimeno (11,2%), $\alpha$ -terpineno, (4,8%) e carvacrol (3,5%).
(Gonçalves et al., 2010), Portugal	<i>T. zygis</i> subsp. <i>sylvestris</i>	carvacrol (1,3–25,0%), timol (5,2–23,8%), geraniol (0,1–19,8%), Acetato de geranilo (0,5–20,8%) e linalol (3,5–30,0%).
(Dandlen et al., 2011), Portugal	<i>T. zygis</i>	<i>p</i> -cimeno (24-40%), carvacrol (1-35%) timol (1-24%)
(Salas et al., 2012), Espanha	<i>T. zygis</i> subsp. <i>gracillis</i>	<i>p</i> -cimeno, $\gamma$ -terpineno e timol.
(Ballester-Costa et al., 2013), Espanha	<i>T. zygis</i>	timol (48,59%), <i>p</i> -cimeno (18,79%) e $\gamma$ -terpineno (8,31%).

## 5. Atividades biológicas do género *Thymus*

O género *Thymus* está entre as plantas aromáticas medicinais mais utilizadas em todo o mundo, em parte devido aos seus óleos essenciais (Stahl-Biskup & Saez, 2002).

Várias espécies de *Thymus* e os respetivos extratos, incluindo os óleos essenciais, são atualmente utilizados contra uma diversidade de doenças (Folcarà & Vanaclocha, 2000; Vladimir-knzevic *et al.*, 2014), devido à ampla gama de propriedades biológicas e terapêuticas que foram relatados para este género. Neste sentido, têm sido reportadas propriedades antiespasmódicas, expetorantes, antissépticas que justificam a sua utilização em diversas afeções respiratórias. As atividades anti-inflamatórias e antissépticas dos tomilhos fundamentam o seu uso em estomatites e algumas afeções do aparelho genital feminino. Entre as várias atividades biológicas reportadas para o tomilho incluem-se ainda o efeito estimulador de secreções gástricas (Salgueiro, 2007), atividade antioxidante, inseticida, antibacteriana, antifúngica, antiviral (Figueiredo *et al.*, 2008). Todas estas atividades estão relacionadas com o elevado conteúdo de compostos fenólicos, com especial ênfase para o timol e carvacrol (Karaman *et al.*, 2001; Rasooli & Mirmostafa, 2003; Rota *et al.*, 2008). Além disso, os tomilhos são utilizados para aplicações aromáticas, culinárias e na conservação de alimentos (Proença da Cunha *et al.*, 2011).

Rasooli & Mirmostafa (2003) verificaram que os compostos aromáticos, tais como o carvacrol, timol (fenóis), e *p*-cimeno contribuíam para mais de 75% da composição química do óleo de muitos tomilhos, como *T. vulgaris* e *T. zygis*, com fortes propriedades antibacterianas. Esses resultados indiciam propriedades antibacterianas promissoras de vários óleos essenciais de género *Thymus*.

As atividades de alguns óleos de tomilhos portugueses foram testadas contra várias estirpes de *Candidas*, *Aspergillus* e *dermatófitos*, pela determinação das concentrações mínimas inibitórias e concentrações mínimas letais. Verificou-se que os óleos de tomilhos fenólicos, nomeadamente os quimiotipos timol e/ou carvacrol de *T. zygis*, *T. pulegioides* apresentavam uma boa atividade antifúngica (Gonçalves *et al.*, 2010; Pina-Vaz *et al.*, 2004; Pinto *et al.*, 2006).

Em relação à atividade antioxidante, foi demonstrado que um suplemento dietético de óleo essencial de tomilho poderia restaurar o equilíbrio desfavorável antioxidante/pró-oxidante associado ao envelhecimento (Youdim & Deans, 1999).

Um estudo científico revelou que a administração de uma combinação de óleos essenciais de tomilho (contendo *p*-cimeno, timol como principais componentes bioativos) e oregão (contendo carvacrol como principal componente bioativo), em concentrações adequadas, pode reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias e atenuar o grau de lesão

do tecido inflamado do cólon e assim melhorar a colite induzida pelo ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) em ratos. Os autores sugerem que a combinação de óleos essenciais de tomilho e orégão apresenta potencial terapêutico como tratamento adicional ou de apoio em inflamações gastrointestinais. No entanto estes resultados foram constatados para uma faixa bastante estreita de concentrações dos óleos essenciais, o que poderá limitar o seu potencial terapêutico / preventivo (Bukovská *et al.*, 2007).

O carvacrol e timol como principais compostos de diversos óleos essenciais, incluído do género *Thymus*, são considerados potenciais fármacos para a doença de Alzheimer, devido ao seu efeito inibitório sobre a acetilcolinesterase (AChE) (Jukic *et al.*, 2007; Orhan *et al.*, 2008). O carvacrol é ainda descrito como anti-tumoral (Arunasree, 2010), anti-inflamatório (Fachini-Queiroz *et al.*, 2012) e neuroprotetor sem afetar a segurança e saúde humana (Yu *et al.*, 2012). O timol como um dos componentes principais dos tomilhos em conjugação com outros compostos evidenciam uma boa atividade anti-inflamatória (Miguel, 2010; Riella *et al.*, 2012).

Um outro composto presente em alguns tomilhos, o borneol, foi também descrito como possuindo propriedades anti-inflamatórias, uma vez que a sua utilização em suplementos dietéticos demonstrou diminuir significativamente os níveis de citocinas pró-inflamatórias de IL-1 $\beta$  e IL-6 em ratos. São relatadas outras propriedades do borneol benéficas para a saúde, incluindo antimicrobianas, analgésicas, anti-stresse (Chen *et al.*, 2010; Juhás *et al.*, 2008), e de eliminação de radicais (Saravanakumar *et al.*, 2012).

O borneol poderá ter efeito neuroprotetor contra a lesão induzida no cérebro por isquemia/ reperfusão (Chen *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2011). Os mecanismos responsáveis por esta atividade podem estar envolvidos com a redução intracelular das espécies reativas de oxigénio (ROS) e isoforma indutível da sintase do óxido nítrico (iNOS), a inibição de libertação do fator inflamatório, a inibição do fator nuclear de transcrição *kappa B* (NF- $\kappa$ B) e vias de transdução do sinal, entre outros fatores que podem desempenhar um papel significativo na neuroprotecção do borneol (Liu *et al.*, 2011). Saravanakumar *et al.*, (2012), demonstraram ainda a capacidade do borneol exercer uma ação protetora sobre o metabolismo hepático.

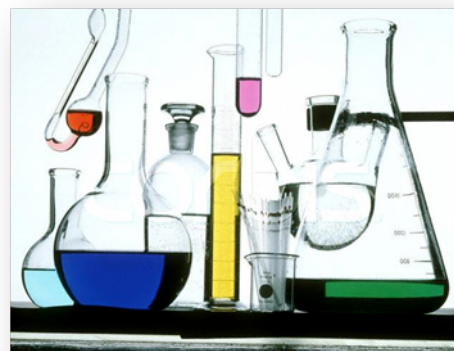
De referir ainda que o óleo essencial de tomilho num estudo demonstrou uma boa atividade anti-inflamatória, em parte devido às elevadas concentrações de carvacrol e timol (Tsai *et al.*, 2011). Vigo *et al.*, (2004) demonstraram que o óleo de tomilho inibiu a produção de NO em macrófagos; no entanto, são escassos os estudos sobre a atividade anti-

inflamatória dos tomilhos (Ocaña & Reglero, 2012), pelo que se torna crucial aprofundar os mecanismos de ação responsáveis pela bioatividade dos mesmos.

## 6. Objetivos

O principal objetivo do presente trabalho consistiu na investigação da bioatividade do óleo essencial de *T. zygis* subsp. *sylvestris*, de uso reconhecido na área alimentar (condimentos). O óleo essencial, previamente caracterizado quimicamente, e os seus compostos principais (*p*-cimeno timol e carvacrol) foram investigados em relação à sua atividade anti-inflamatória, utilizando ensaios *in vitro* realizados em linhas celulares preponderantes na resposta inflamatória periférica e central (macrófagos (Raw 264.7) e microglia (BV2), respetivamente), analisando simultaneamente a toxicidade celular do óleo para concentrações detentoras de bioatividade relevante. O perfil toxicológico do óleo essencial de *T. zygis* subsp. *sylvestris* e dos seus compostos maioritários foi ainda investigado noutros tipos celulares humanas, nomeadamente queratinócitos (HacaT), hepatócitos (HepG2) e células de epitélio alveolar (A549).

A relevante bioatividade demonstrada pelo óleo essencial de *T. zygis* subsp. *sylvestris* e pelos seus compostos maioritários, nomeadamente as suas propriedades anti-inflamatórias observadas para concentrações isentas de citotoxicidade sustenta a sua possível aplicação nas indústrias farmacêutica, cosmética e/ou nutracêutica.



## **II- MATERIAIS E MÉTODOS**

## I. Materiais e métodos

### I.1. Material vegetal

Partes aéreas floridas de *T. zygis* subsp. *sylvestris* foram colhidas na Serra de Aire e Candeeiros. Um exemplar testemunho foi depositado no Herbário de Plantas Medicinais, Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra.

### I.2. Isolamento e análise do óleo essencial

O óleo essencial foi isolado por hidrodestilação durante 3 horas utilizando um aparelho do tipo Clevenger, de acordo com o procedimento descrito na Farmacopeia Europeia (Farmacopeia Portuguesa, 2005).

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

Na tabela I, encontra-se a informação relativa ao rendimento em óleo essencial, os principais compostos identificados na espécie em estudo e a sua proveniência.

**Tabela I** - Proveniência de *T. zygis* subsp. *sylvestris*, rendimento em óleo essencial e compostos principais.

<b>Espécie</b>	<b>Rendimento</b>	<b>Compostos principais</b>	<b>Proveniência</b>
<b><i>T. zygis</i> subsp. <i>sylvestris</i></b>	1,2 % (p/v)	<i>p</i> -cimeno: 22,1% timol: 19,5% carvacrol: 15,9% <i>γ</i> -terpineno: 7,4%	Serra de Aire e Candeeiros

## 2. Avaliação da atividade anti-inflamatória

### 2.1. Culturas celulares e materiais

A linha celular de macrófagos (Raw 264.7), obtida da *American Típe Culture Colection* (TIB-71), foi gentilmente cedida pela Doutora Otília Vieira do Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra. As células foram cultivadas em *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), com 3,02 g/L de bicarbonato de sódio (Sigma), 100 U/mL de penicilina (Sigma), 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma), suplementado com 10 % de soro fetal bovino não inativado, e mantidas a 37°C numa atmosfera humidificada de 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub>.

A linha celular de microglia (BV2) foi adquirida à Banca Biologica e Cell Fatory, Centro di Risorse Biologiche, Genova. As células foram cultivadas em *Roswell Park Memorial Institute médium* (RPMI), com 3,02 g/L de bicarbonato de sódio, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado, e mantidas a 37°C numa atmosfera humidificada de 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub>.

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

### 2.2. Produção de óxido nítrico (NO)

A atividade anti-inflamatória do óleo essencial de *T. zygis* subsp. *sylvestris* e dos seus compostos principais: *p-cimeno* (The British drug house LTD), timol (The British drug house LTD) e carvacrol (Eastman Organic chemicals), foi avaliada na linha celular macrófagos (Raw 264.7) e de microglia (BV2).

A produção de óxido nítrico (NO) foi avaliada pela deteção da acumulação de nitritos nos sobrenadantes das culturas celulares, utilizando uma reação colorimétrica com recurso ao reagente de Griess (Cruz *et al.*, 2001; Green *et al.*, 1982).

As células de macrófagos (Raw 264.7) e microglia (BV2) foram cultivadas em microplacas de 48 poços (MW 48), numa concentração de  $0,6 \times 10^6 / 0,3 \times 10^6$  por poço respetivamente, e deixadas a estabilizar durante 12 horas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após 12 horas, o meio foi removido e foram adicionados 600 µL de meio de cultura aos poços controlo e 588 uL aos restantes poços. O óleo essencial e os compostos principais foram solubilizados em DMSO e meio de cultura nas concentrações de 0,08-0,64 µL/mL, dos quais

12 µL foram adicionados a cada poço. Após 1 hora, as células foram ativadas com 1 µg/mL de lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* (serotipo 026:B6) durante 24 horas, nas condições de cultura referidas.

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

Foram realizadas três ensaios independentes com o óleo essencial de *T. zygis* subsp. *sylvestris* e um ensaio com os seus compostos principais (*p*-cimeno, timol e carvacrol). Os resultados foram expressos em percentagem de produção de nitritos pelas células na presença de LPS.

### 3. Avaliação da citotoxicidade

#### 3.1. Cultura celular e materiais

A linha celular de queratinócitos humanos (HaCaT), adquiridos à DKFZ (Heidelberg), foi gentilmente cedida pela Doutora Eugénia Carvalho (Centro de Neurociências e Biologia Celular, Universidade de Coimbra). Os queratinócitos foram cultivados em *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (alto teor de glucose), suplementado com 3,7 g/L de bicarbonato de sódio, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 4 mM de glutamina, 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor, e mantidos a 37°C numa atmosfera humidificada de 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub>.

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

A linha celular de epitélio alveolar humano (A549) foi adquirida à ATCC (número CCL-185). As células epiteliais alveolares foram cultivadas no mesmo meio utilizado para os queratinócitos e acima referido.



A metodologia de cultura das linhas celulares de microglia (BV2) e de macrófagos (Raw 264.7) foi anteriormente descrita na secção 2.2.

Ao longo das experiências, as células foram monitorizadas por observação ao microscópio a fim de detetar qualquer alteração morfológica.

### 3.2. Determinação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT

A viabilidade celular foi avaliada para o óleo essencial de *T. zygis* subsp. *sylvestris* e para os compostos principais do óleo essencial, p-cimeno, timol e carvacrol, nas linhas celulares de: macrófagos (Raw 264.7), microglia (BV2), queratinócitos (HaCaT), hepatócitos (HepG2) e epitélio alveolar (A549).

A avaliação da viabilidade celular foi realizada através de um ensaio colorimétrico usando o composto 3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil brometo de tetrazólico (MTT) (Mosmann, 1983). Neste método, a densidade ótica da solução contendo os cristais de formazano produzidos por células metabolicamente ativas foi medido espectrofotometricamente.

As linhas celulares de macrófagos (Raw 264.7), microglia (BV2), queratinócitos (HaCaT), hepatócitos (HepG2) e epitélio alveolar (A549) foram cultivadas nas densidades de:  $0,6 \times 10^6$ ;  $0,3 \times 10^6$ ;  $0,2 \times 10^6$ ;  $0,2 \times 10^6$ ;  $0,2 \times 10^6$  células por poço, respetivamente. As células foram cultivadas em microplacas de 48 poços e incubadas num volume final de 600  $\mu$ L durante 12 horas, e foram posteriormente incubadas durante 24 horas com 12  $\mu$ L das diferentes concentrações (0,08-0,64  $\mu$ L/mL) do óleo essencial e dos seus principais compostos.

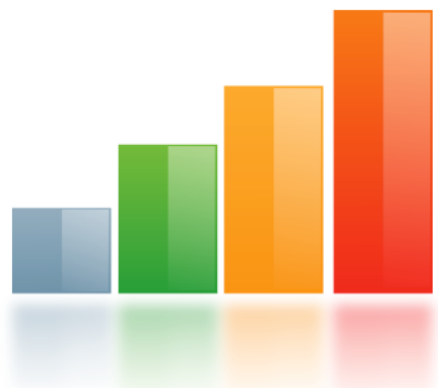
Após 24h, adicionaram-se 60  $\mu$ L de uma solução de MTT (5 mg/mL em PBS), por poço, às células de queratinócitos (HaCaT), hepatócitos (Hep G2) e epitélio alveolar (A549) e 43  $\mu$ L às células de macrófagos (Raw 264.7) e microglia (BV2). As células foram incubadas a 37°C, numa atmosfera humidificada de 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub>. Os queratinócitos (HaCaT) foram incubados durante 30 minutos; as células de microglia (BV2), macrófagos (Raw 264.7) e hepatócitos (Hep G2) foram incubadas durante 1 hora e a linha celular de epitélio alveolar (A549) durante 2 horas e 30 minutos. Após estes tempos de incubação com MTT, os sobrenadantes foram rejeitados e adicionaram-se 300  $\mu$ L de isopropanol ácido (0,04 N HCl em isopropanol) às células aderentes para solubilizar os cristais azuis de formazano. A quantificação de cristais de formazano foi realizada utilizando um leitor automático de microplacas ELISA, com um comprimento de onda de 570 nm e com um filtro de referência de 620 nm.

Foram realizadas três ensaios independentes no óleo essencial de *T. zygis* subsp. *sylvestris* e um ensaio com os seus compostos principais (*p*-cimeno, timol e carvacrol). Os resultados foram expressos em percentagem da redução do MTT por células cultivadas com meio de cultura (controlo).

#### **4. Análise de dados**

Os resultados foram expressos como média $\pm$ SEM (erro padrão da média) do número de experiências indicadas. Para o tratamento estatístico dos resultados realizou-se uma análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do pós teste de *Dunnett's*, para comparar o efeito das diferentes concentrações de óleo essencial nas células estimuladas por LPS com as células estimuladas apenas na presença de LPS (nível de significância: \*\*\* $p < 0,001$ ). Adicionalmente foi aplicado um test-t, para verificar se o LPS estimulou a produção de nitritos em comparação com células cultivadas apenas na presença de meio de cultura (controlo) (nível de significância \*\*\* $p < 0,001$ ). As análises estatísticas foram aplicadas usando o programa GraphPadPrism, versão 5.02 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

### III- RESULTADOS

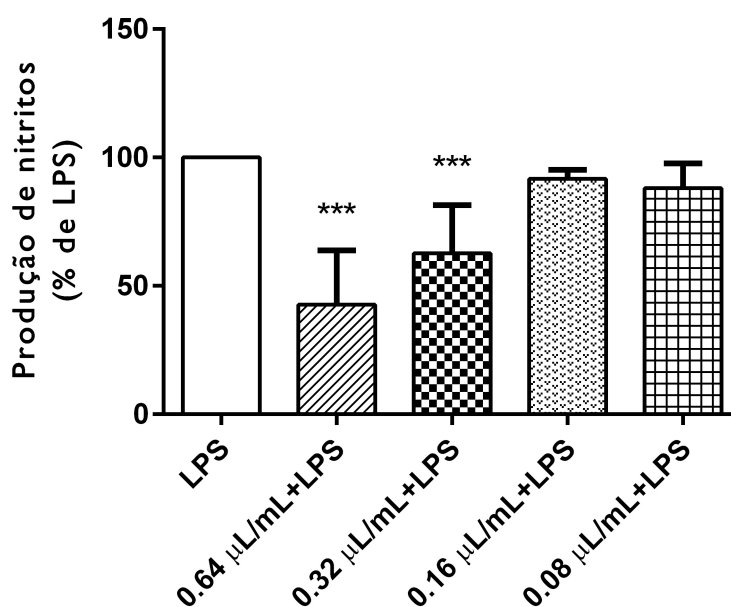


## I. Produção de óxido nítrico

No presente trabalho avaliou-se o efeito anti-inflamatório (inibição da produção de NO) da amostra de óleo de *T. zygis* subsp. *sylvestris* e dos seus compostos principais, *p*-cimeno, timol e carvacrol, sendo os resultados apresentados de seguida.

### I.1. Efeito do óleo essencial e dos seus compostos principais na produção de óxido nítrico induzida por LPS em macrófagos (Raw 264.7)

O efeito do óleo essencial na produção de NO desencadeada por LPS foi avaliado na linha celular de macrófagos (Raw 264.7). Após a estimulação com LPS na presença das quatro concentrações do óleo essencial (Fig.9), a produção de nitritos foi reduzida para:  $42,67 \pm 12,24$  ( $0,64 \mu\text{L/mL}$ ),  $62,67 \pm 10,84$  ( $0,32 \mu\text{L/mL}$ ),  $91,67 \pm 2,03$  ( $0,16 \mu\text{L/mL}$ ) e  $88,00 \pm 5,57$  ( $0,08 \mu\text{L/mL}$ ), relativamente a células cultivadas apenas na presença de LPS.



**Figura 9** - Efeito do óleo essencial de *T. zygis* subsp. *sylvestris* na inibição da produção de nitritos em macrófagos (Raw 264.7). Os macrófagos ( $0,6 \times 10^6$  células/poço) foram mantidos em meio de cultura (controle), ou estimulados com  $1 \mu\text{g/mL}$  de LPS, ou cultivadas na presença de LPS e de diferentes concentrações de óleo essencial ( $0,64$ - $0,08 \mu\text{L/mL}$ ), durante 24h. Os resultados estão expressos em percentagem de produção de nitritos pelas células na presença de LPS. Cada valor corresponde à média  $\pm$  SEM de três experiências independentes, realizadas em duplicado (\*\*\*)  $p < 0,001$ , comparado com LPS).

O efeito dos compostos principais de *T. zygis* subsp. *sylvestris* na produção de NO desencadeada por LPS foi avaliado na linha celular de macrófagos (Raw 264.7). Após a estimulação com LPS na presença das quatro concentrações de *p-cimeno*, timol e carvacrol (Tab.2), a produção de nitritos foi reduzida para: 8,45 (0,64 µL/mL), 74,49 (0,32 µL/mL), 80,17 (0,16 µL/mL), 92,57 (0,08 µL/mL), 8,03 (0,64 µL/mL), 8,25 (0,32 µL/mL), 8,74 (0,16 µL/mL), 27,77 (0,08 µL/mL) 1,00 (0,64 µL/mL), 1,00 (0,32 µL/mL), 45,00 (0,16 µL/mL), 63,00 (0,08 µL/mL), respetivamente.

**Tabela 2** - Efeito do óleo essencial e compostos principais de *T. zygis* subsp. *sylvestris* na inibição da produção de nitritos em macrófagos (Raw 264.7).

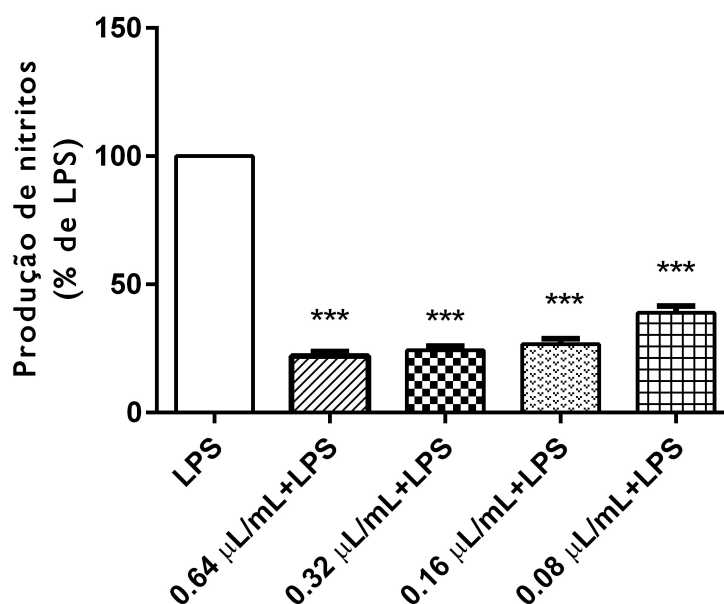
Óleo essencial e compostos principais	Concentração, média ± SEM *			
	0,64 µL/mL	0,32 µL/mL	0,16 µL/mL	0,08 µL/mL
<b>Tzs</b>	42,67±12,24***	62,67±10,84***	91,67±2,03	88,00±5,57
<b>p-cimeno</b>	8,45	74,49	80,17	92,57
<b>timol</b>	8,03	8,25	8,74	27,77
<b>carvacrol</b>	1,00	1,00	45,00	63,00

Os resultados estão expressos em percentagem de produção de nitritos pelas células na presença de LPS. \*SEM-erro padrão da média (os resultados referentes ao óleo essencial apresentam valores de SEM, os resultados referentes aos compostos principais não apresentam valores de SEM nem análise estatística uma vez que foi apenas efetuado um ensaio para cada um deles), (\*\*\*)  $p < 0,001$ , comparado com LPS).

**Tzs**- *Thymus zygis* subsp. *Sylvestris*

## 1.2. Efeito do óleo essencial e dos seus compostos principais na produção de óxido nítrico induzida por LPS em células de microglia (BV2)

O efeito do óleo essencial na produção de NO desencadeada por LPS foi avaliado na linha celular de microglia (BV2). Após a estimulação com LPS na presença das quatro concentrações do óleo essencial (Fig.10), a produção de nitritos foi reduzida para: 22±1,19 (0,64 µL/mL), 24,34±1,26 (0,64 µL/mL), 26,71±1,64 (0,16 µL/mL) e 38,94±1,78 (0,08 µL/mL), relativamente a células cultivadas apenas na presença de LPS.



**Figura 10** - Efeito do óleo essencial de *T. zygis* subsp. *sylvestris* na inibição da produção de nitritos em células da microglia (BV2). As células de microglia ( $0,3 \times 10^6$  células/poço) foram mantidas em meio de cultura (controle), ou estimuladas com  $1 \mu\text{g/mL}$  de LPS, ou cultivadas na presença de LPS e de diferentes concentrações de óleo essencial ( $0,64$ - $0,08 \mu\text{L/mL}$ ), durante 24h. Os resultados estão expressos em percentagem de produção de nitritos pelas células na presença de LPS. Cada valor corresponde à média  $\pm$  SEM de três experiências independentes, realizadas em duplicado (\*\*\*)  $p < 0,001$ , comparado com LPS).

O efeito dos compostos principais de *T. zygis* subsp. *sylvestris* na produção de NO desencadeada por LPS foi avaliada na linha celular de microglia (BV2). Após a estimulação com LPS na presença das quatro concentrações de *p-cimeno*, timol e carvacrol (Tab.3), a produção de nitritos foi reduzida para: 33,82 ( $0,64 \mu\text{L/mL}$ ), 32,94 ( $0,32 \mu\text{L/mL}$ ), 38,55 ( $0,16 \mu\text{L/mL}$ ), 59,41 ( $0,08 \mu\text{L/mL}$ ), 34,41 ( $0,64 \mu\text{L/mL}$ ), 35,00 ( $0,32 \mu\text{L/mL}$ ), 35,88 ( $0,16 \mu\text{L/mL}$ ), 33,53 ( $0,08 \mu\text{L/mL}$ ), 22,89 ( $0,64 \mu\text{L/mL}$ ), 17,39 ( $0,32 \mu\text{L/mL}$ ), 16,75 ( $0,16 \mu\text{L/mL}$ ), 16,88 ( $0,08 \mu\text{L/mL}$ ), respectivamente.

**Tabela 3** - Efeito do óleo essencial e compostos principais de *T. zygis* subsp. *sylvestris* na inibição da produção de nitritos em células de microglia (BV2).

Óleo essencial e compostos principais	Concentração, média $\pm$ SEM *			
	0,64 $\mu$ L/mL	0,32 $\mu$ L/mL	0,16 $\mu$ L/mL	0,08 $\mu$ L/mL
<b>Tzs</b>	22,00 $\pm$ 1,03***	24,34 $\pm$ 0,96***	26,72 $\pm$ 1,25***	38,94 $\pm$ 1,48***
<b>p-cimeno</b>	33,82	32,94	38,53	59,41
<b>timol</b>	34,41	35,00	35,88	33,53
<b>carvacrol</b>	22,89	17,39	16,75	16,88

Os resultados estão expressos em percentagem de produção de nitritos pelas células na presença de LPS. \*SEM-erro padrão da média (os resultados referentes ao óleo essencial apresentam valores de SEM, os resultados referentes aos compostos principais não apresentam valores de SEM nem análise estatística uma vez que foi apenas efetuado um ensaio para cada um deles), (\*\*\*)  $p < 0,001$ , comparado com LPS).

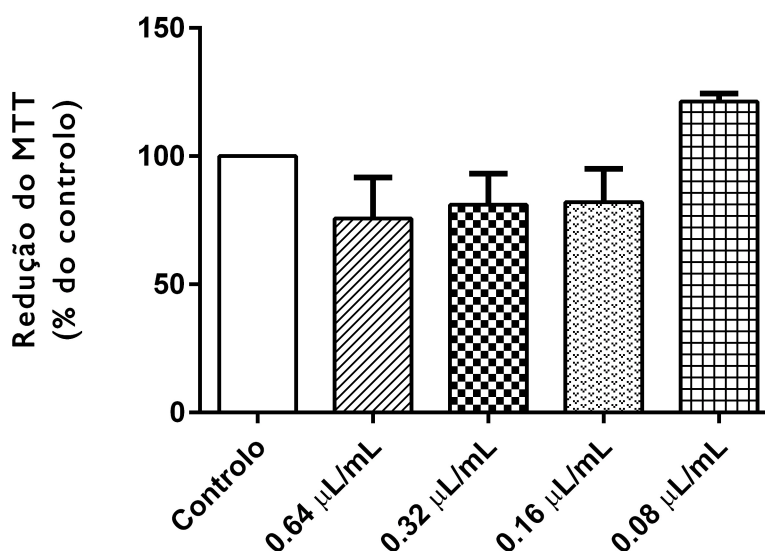
**Tzs**- *Thymus zygis* subsp. *sylvestris*

## 2. Avaliação da viabilidade celular

Para avaliar a potencial atividade citotóxica do óleo e dos compostos principais de *T. zygis* subsp. *sylvestris*, realizou-se o ensaio de MTT nas linhas celulares de macrófagos (Raw 264.7), microglia (BV2), queratinócitos (HaCaT), hepatócitos (Hep G2) e epitélio alveolar (A549).

### 2.1. Efeito do óleo essencial e dos seus compostos principais na viabilidade celular de macrófagos (Raw 264.7)

Como demonstrado na figura 11, o óleo essencial de *T. zygis* subsp. *sylvestris* não apresentou citotoxicidade significativa em macrófagos (Raw 264.7) para as concentrações de 0,64  $\mu$ L/mL (75,67 $\pm$ 9,28), 0,32  $\mu$ L/mL (81,00 $\pm$ 7,02), 0,16  $\mu$ L/mL (82,00 $\pm$ 7,51) e 0,08  $\mu$ L/mL (121,3 $\pm$ 1,75) (Fig.11). Contudo, os compostos principais do óleo essencial p-cimeno, timol e carvacrol revelaram citotoxicidade para todas as concentrações testadas (Tab.4).



**Figura 11** - Efeito do óleo essencial de *T. zygis* subsp. *sylvestris* na viabilidade celular de macrófagos (ensaio do MTT). As células de macrófagos (Raw 264.7) foram expostas a diferentes concentrações do óleo essencial (0,64-0,08 µL/mL), durante 24h. Os resultados estão expressos em percentagem de redução do MTT por células cultivadas na presença de meio de cultura (controle). Cada valor corresponde à média  $\pm$  SEM de três experiências independentes, realizadas em duplicado.

**Tabela 4** - Efeito do óleo essencial e compostos principais de *T. zygis* subsp. *sylvestris* na viabilidade celular de macrófagos (Raw 264.7) (ensaio do MTT).

Óleo essencial e compostos principais	Concentração, média $\pm$ SEM*			
	0,64 µL/mL	0,32 µL/mL	0,16 µL/mL	0,08 µL/mL
<b>Tzs</b>	75,67 $\pm$ 9,28	81,00 $\pm$ 7,02	82,00 $\pm$ 7,51	121,3 $\pm$ 1,75
<b>p-cimeno</b>	1,39	49,68	46,60	69,36
<b>timol</b>	0,25	0,63	0,57	41,30
<b>carvacrol</b>	2,00	1,00	36,00	73,00

Os resultados estão expressos em percentagem de redução do MTT por células cultivadas na presença de meio de cultura (controle). \*SEM-erro padrão da média (os resultados referentes ao óleo essencial apresentam valores de SEM, os resultados referentes aos compostos principais não apresentam valores de SEM nem análise estatística uma vez que foi apenas efetuado um ensaio para cada um deles).

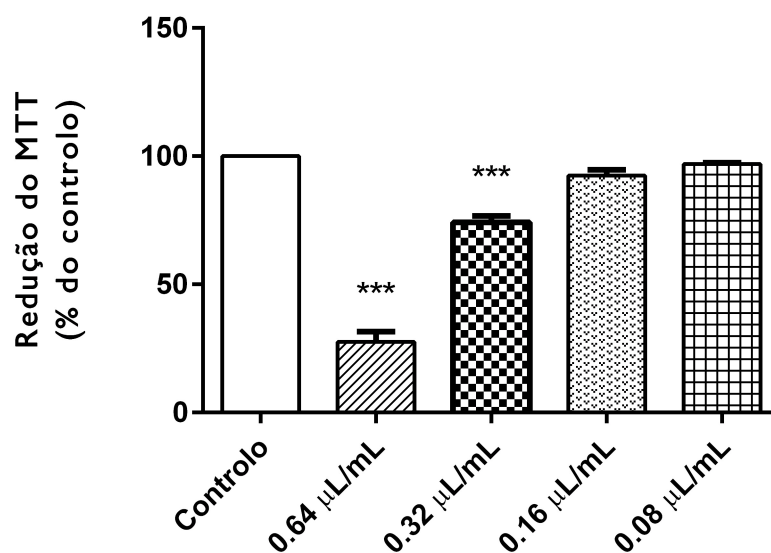
**Tzs**- *Thymus zygis* subsp. *sylvestris*



## 2.2. Efeito do óleo essencial e dos seus compostos principais na viabilidade de microglia (BV2)

Como demonstrado na figura 12, o óleo essencial de *T. zygis* subsp. *sylvestris* não apresentou citotoxicidade significativa em células de microglia (BV2) para as concentrações de 0,16  $\mu\text{L/mL}$  ( $92,45 \pm 1,28$ ) e 0,08  $\mu\text{L/mL}$  ( $96,98 \pm 0,24$ ). As concentrações de 0,64  $\mu\text{L/mL}$  ( $27,54 \pm 2,36$ ) e 0,32  $\mu\text{L/mL}$  ( $74,24 \pm 1,40$ ) demonstraram citotoxicidade.

Os compostos principais do óleo essencial timol e carvacrol revelaram citotoxicidade em células de microglia (BV2), para todas as concentrações testadas. O composto *p*-cimeno não apresentou citotoxicidade significativa para as concentrações de 0,16  $\mu\text{L/mL}$  (85,66) e 0,08  $\mu\text{L/mL}$  (99,04) (Tab.5).



**Figura 12** - Efeito do óleo essencial de *T. zygis* subsp. *sylvestris* na viabilidade celular de microglia (BV2) (ensaio do MTT). Células de microglia (BV2) foram expostas a diferentes concentrações do óleo essencial (0,64-0,08  $\mu\text{L/mL}$ ), durante 24h. Os resultados estão expressos em percentagem de redução do MTT por células cultivadas na presença de meio de cultura (controle). Cada valor corresponde à média  $\pm$  SEM de três experiências independentes, realizadas em duplicado (\*\*\*)  $p < 0,001$ , comparado com o controle).

**Tabela 5** - Efeito do óleo essencial e compostos principais de *T. zygis* subsp. *sylvestris* na viabilidade celular de microglia (BV2) (ensaio do MTT).

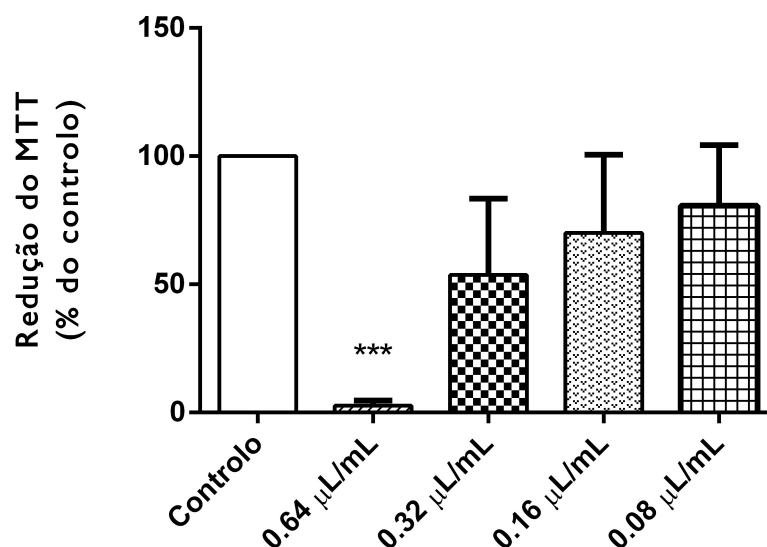
Óleo essencial e compostos principais	Concentração, média $\pm$ SEM* ( $\mu\text{L/mL}$ )			
	0,64	0,32	0,16	0,08
<b>Tzs</b>	27,54 $\pm$ 2,36***	74,24 $\pm$ 1,40***	92,45 $\pm$ 1,28	96,98 $\pm$ 0,24
<b>p-cimeno</b>	29,28	34,98	85,66	99,04
<b>timol</b>	0,74	0,63	1,21	4,93
<b>carvacrol</b>	3,48	6,89	7,74	7,96

Os resultados estão expressos em percentagem de redução do MTT por células cultivadas na presença de meio de cultura (controlo). \*SEM-erro padrão da média (os resultados referentes ao óleo essencial apresentam valores de SEM, os resultados referentes aos compostos principais não apresentam valores de SEM nem análise estatística uma vez que foi apenas efetuado um ensaio para cada um deles), (\*\*\*)  $p < 0,001$ , comparado com o controlo).

**Tzs**- *Thymus zygis* subsp. *sylvestris*

### 2.3. Efeito do óleo essencial e dos seus compostos principais na viabilidade de queratinócitos (HaCaT)

Como demonstrado na figura 13, o óleo essencial de *T. zygis* subsp. *sylvestris* não apresentou citotoxicidade significativa em queratinócitos (HaCaT) para as concentrações de 0,32  $\mu\text{L/mL}$  (53,67 $\pm$ 17,17), 0,16  $\mu\text{L/mL}$  (70,00 $\pm$ 17,62) e 0,08  $\mu\text{L/mL}$  (80,67 $\pm$ 13,62). O valor da concentração 0,64  $\mu\text{L/mL}$  (2,67 $\pm$ 1,20), quando comparado com o controlo revelou elevada citotoxicidade.



**Figura 13** - Efeito do óleo essencial de *T. zygis* subsp. *sylvestris* na viabilidade celular de queratinócitos (HaCaT) (ensaio do MTT). Células de hepatócitos foram expostas a diferentes concentrações do óleo essencial (0,64-0,08 µL/mL), durante 24h. Os resultados estão expressos em percentagem de redução do MTT por células cultivadas na presença de meio de cultura (controlo). Cada valor corresponde à média ± SEM de três experiências independentes, realizadas em duplicado (\*\*\*)  $p < 0,001$ , comparado com o controlo).

Os compostos principais do óleo essencial timol e carvacrol demonstraram citotoxicidade em queratinócitos (HaCaT) para todas as concentrações testadas. O composto *p*-cimeno não apresentou citotoxicidade significativa para as concentrações de 0,16 µL/mL (75,03) e 0,08 µL/mL (88,88) (Tab.6).

**Tabela 6** - Efeito do óleo essencial e compostos principais de *T. zygis* subsp. *sylvestris* na viabilidade celular de queratinócitos (HaCaT) (ensaio do MTT).

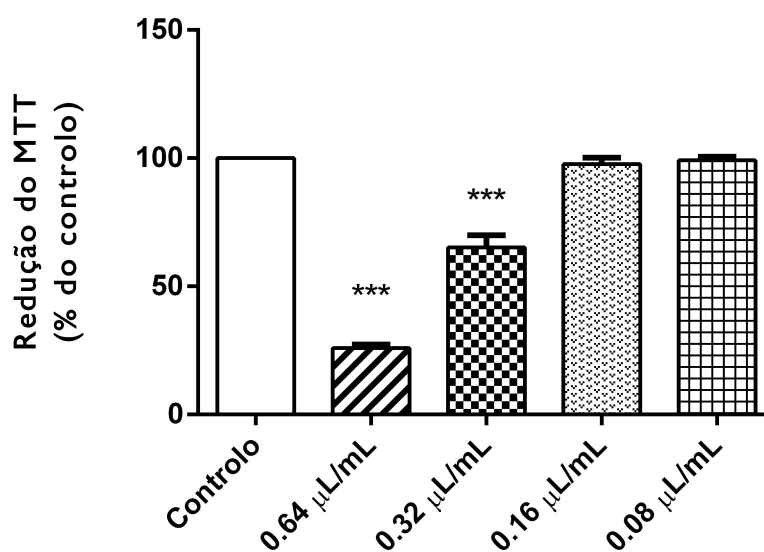
Óleo essencial e compostos principais	Concentração, média ± SEM* (µL/mL)			
	0,64	0,32	0,16	0,08
<b>Tzs</b>	2,67±1,20***	53,67±17,17	70,00±17,62	80,67±13,62
<b>p-cimeno</b>	1,57	2,41	75,03	88,88
<b>timol</b>	6,40	6,61	6,51	6,51
<b>carvacrol</b>	1,78	1,68	1,05	3,99

Os resultados estão expressos em percentagem de redução do MTT por células cultivadas na presença de meio de cultura (controlo). \*SEM-erro padrão da média (os resultados referentes ao óleo essencial apresentam valores de SEM, os resultados referentes aos compostos principais não apresentam valores de SEM nem análise estatística uma vez que foi apenas efetuado um ensaio para cada um deles), (\*\*\*)  $p < 0,001$ , comparado com o controlo).

**Tzs**- *Thymus zygis* subsp. *sylvestris*

## 2.4. Efeito do óleo essencial e dos seus compostos principais na viabilidade de hepatócitos (Hep G2)

Como demonstrado na figura 14, o óleo essencial de *T. zygis* subsp. *sylvestris* não apresentou citotoxicidade significativa em hepatócitos (Hep G2) para as concentrações de 0,16  $\mu\text{L/mL}$  ( $97,73\% \pm 1,87$ ) e 0,08  $\mu\text{L/mL}$  ( $99,17\% \pm 1,02$ ). As concentrações de 0,64  $\mu\text{L/mL}$  ( $25,95 \pm 0,81$ ) e 0,32  $\mu\text{L/mL}$  ( $65,23 \pm 2,70$ ) revelaram citotoxicidade.



**Figura 14** - Efeito do óleo essencial de *T. zygis* subsp. *sylvestris* na viabilidade celular de hepatócitos (Hep G2) (ensaio do MTT). Células de hepatócitos (Hep G2) foram expostas a diferentes concentrações do óleo essencial (0,64-0,08  $\mu\text{L/mL}$ ), durante 24h. Os resultados estão expressos em percentagem de redução do MTT por células cultivadas na presença de meio de cultura (controlo). Cada valor corresponde à média  $\pm$  SEM de três experiências independentes, realizadas em duplicado (\*\*\*)  $p < 0,001$ , comparado com o controlo).

Os compostos principais do óleo essencial timol e carvacrol revelaram citotoxicidade para todas as concentrações testadas. O composto *p*-cimeno, não apresentou citotoxicidade significativa para as concentrações de 0,16  $\mu\text{L/mL}$  (95,84) e 0,08  $\mu\text{L/mL}$  (101,41), (Tab.7).

**Tabela 7** - Efeito do óleo essencial e compostos principais de *T. zygis* subsp. *sylvestris* na viabilidade celular de hepatócitos (Hep G2) (ensaio do MTT).

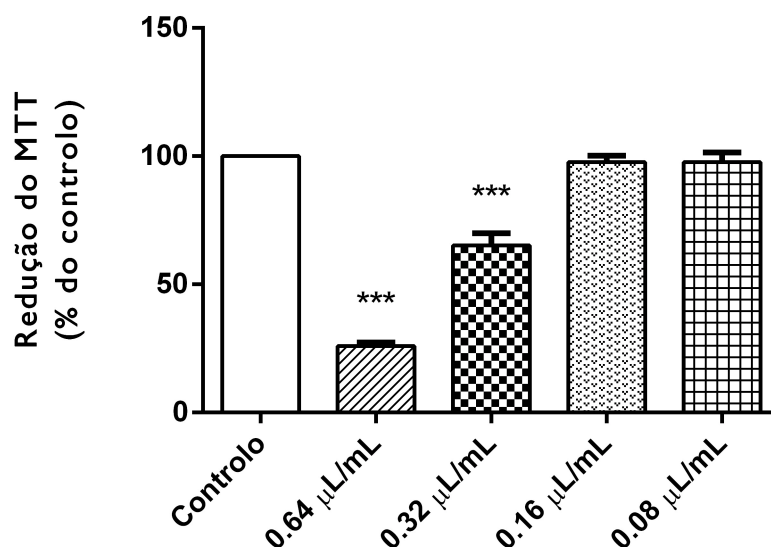
Óleo essencial e compostos principais	Concentração, média $\pm$ SEM* ( $\mu\text{L/mL}$ )			
	0,64	0,32	0,16	0,08
<b>Tzs</b>	25,95 $\pm$ 0,81***	65,23 $\pm$ 2,70***	97,73 $\pm$ 1,41	99,17 $\pm$ 0,81
<b><i>p</i>-cimeno</b>	3,49	28,45	95,84	101,41
<b>timol</b>	3,24	2,57	3,00	9,90
<b>carvacrol</b>	1,33	1,33	0,92	3,66

Os resultados estão expressos em percentagem de redução do MTT por células cultivadas na presença de meio de cultura (controlo). \*SEM-erro padrão da média (os resultados referentes ao óleo essencial apresentam valores de SEM, os resultados referentes aos compostos principais não apresentam valores de SEM nem análise estatística uma vez que foi apenas efetuado um ensaio para cada um deles), (\*\*\*)  $p < 0,001$ , comparado com o controlo).

**Tzs**- *Thymus zygis* subsp. *sylvestris*

## 2.5. Efeito do óleo essencial e dos seus compostos principais na viabilidade de células de epitélio alveolar (A549)

Como demonstrado na figura 15, o óleo essencial de *T. zygis* subsp. *sylvestris* não apresentou citotoxicidade significativa em células de epitélio alveolar (A549), para as concentrações de 0,16  $\mu\text{L/mL}$  (97,33% $\pm$ 1,87) e 0,08  $\mu\text{L/mL}$  (97,66 $\pm$ 2,81). As concentrações de 0,64  $\mu\text{L/mL}$  (25,95 $\pm$ 0,81) e 0,32  $\mu\text{L/mL}$  (65,23 $\pm$ 2,70) revelaram citotoxicidade.



**Figura 15** - Efeito do óleo essencial de *T. zygis* subsp. *sylvestris* na viabilidade celular de células de epitélio alveolar (A549) (ensaio do MTT). Células de epitélio alveolar foram expostas a diferentes concentrações do óleo essencial (0,64-0,08 µL/mL), durante 24h. Os resultados estão expressos em percentagem de redução do MTT por células cultivadas na presença de meio de cultura (controle). Cada valor corresponde à média  $\pm$  SEM de três experiências independentes, realizadas em duplicado (\*\*\*)  $p < 0,001$ , comparado com o controle).

Os componentes principais do óleo essencial timol e carvacrol demonstraram citotoxicidade para todas as concentrações estudadas. O composto *p*-cimeno, não apresentou citotoxicidade significativa para as concentrações de 0,16 µL/mL (97,69) e 0,08 µL/mL (93,71) (Tab.8).

**Tabela 8** - Efeito do óleo essencial e compostos principais de *T. zygis* subsp. *sylvestris* na viabilidade celular de células de epitélio alveolar (A549) (ensaio do MTT).

Óleo essencial e compostos principais	Concentração, média $\pm$ SEM* (µL/mL)			
	0,64	0,32	0,16	0,08
<b>Tzs</b>	25,95 $\pm$ 0,81***	65,23 $\pm$ 2,70***	97,73 $\pm$ 1,41	97,66 $\pm$ 2,17
<b><i>p</i>-cimeno</b>	3,18	25,64	97,69	93,71
<b>timol</b>	0,71	1,68	3,26	44,62
<b>carvacrol</b>	1,02	0,51	1,38	18,31

Os resultados estão expressos em percentagem de redução do MTT por células cultivadas na presença de meio de cultura (controle). \*SEM-erro padrão da média (os resultados referentes ao óleo essencial apresentam valores de SEM, os resultados referentes aos compostos principais não apresentam valores de SEM nem análise estatística uma vez que foi apenas efetuado um ensaio para cada um deles), (\*\*\*)  $p < 0,001$ , comparado com o controle).

**Tzs**- *Thymus zygis* subsp. *sylvestris*



#### **IV- DISCUSSÃO E CONCLUSÃO**

Estudos científicos efetuados nas últimas décadas têm revelado que a maioria das doenças crônicas, incluindo cancro, diabetes, esclerose múltipla, doenças neurodegenerativas e doenças cardiovasculares, estão associadas a inflamação crônica. A inflamação é um processo imunológico complexo mediado pela ativação das células da imunidade inata, nomeadamente macrófagos. Durante o processo inflamatório, os macrófagos são recrutadas para o local de lesão, o que leva a um aumento local da libertação e acumulação de espécies reativas de oxigénio e nitrogénio, nomeadamente óxido nítrico (NO). Por outro lado, estas células inflamatórias produzem também mediadores solúveis, tais como citocinas e quimiocinas, que recrutam células inflamatórias adicionais para o local da lesão, responsáveis pela propagação e amplificação da resposta inflamatória. Os mediadores pró-inflamatórios produzidos ativam ainda cascatas de transdução de sinal, nomeadamente fatores de transcrição, que controlam a expressão de genes que codificam mais proteínas inflamatórias, nomeadamente a ciclo-oxigenase-2 (COX-2), a isoforma indutível da sintase do óxido nítrico (iNOS), citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1 (IL-1) e IL-6) e ainda quimiocinas. Este ambiente inflamatório/oxidativo leva a um círculo vicioso, que quando sustentado durante um longo período de tempo, promove o desenvolvimento de patologias crônicas, nomeadamente artrite reumatóide, diabetes, doenças cardiovasculares, esclerose múltipla e doenças neurodegenerativas (Ferrero-Miliani *et al.*, 2007; Silveira e Sá *et al.*, 2014). Estas patologias crônicas continuam a constituir um enigma terapêutico, apesar dos sucessos recentes com biofármacos (anticorpos ou recetores solúveis).

No entanto, a falta de resposta do doente, o desenvolvimento de resistência a estes fármacos, problemas de administração e ainda os elevados custos resultantes da sua produção, impõem uma investigação e procura permanente de novas moléculas com propriedades anti-inflamatórias. Compostos que têm como alvo intracelular as vias de transdução de sinal e que interrompem a cascata de produção de mediadores inflamatórios, nomeadamente o óxido nítrico, possuem um elevado potencial anti-inflamatório (Miguel, 2010; Silveira e Sá *et al.*, 2014).

Várias plantas usadas em medicina tradicional são utilizadas no tratamento de patologias associadas a uma componente inflamatória (Darshan & Doreswamy, 2004; Kamatou & Viljoen, 2010; Silveira e Sá *et al.*, 2013). Nos últimos anos, o uso de produtos naturais tem-se destacado como fonte de compostos bioativos, na alimentação e nos cuidados de saúde, para além do seu vasto uso nas indústrias de perfumaria e cosmética (Burt, 2004; Edris, 2007; Proença da Cunha *et al.*, 2007). A procura de substâncias naturais, biologicamente ativas, tem encorajado a utilização de metabolitos secundários, tais como os



óleos essenciais (OE), obtidos a partir de plantas aromáticas e medicinais, por serem compostos de baixo peso molecular, biodegradáveis, capazes de atravessarem a barreira hemato-encefálica, normalmente isentos de toxicidade e com propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e microbidas (Miguel, 2010; Simões *et al.*, 1999). Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito anti-inflamatório do óleo essencial do taxon *T. zygis* subsp. *sylvestris*, uma planta muito usada na medicina tradicional e como condimento. De facto, as propriedades biológicas de diversas espécies de *Thymus* têm sido investigadas em vários modelos *in vitro* e *in vivo* (Albano & Miguel, 2011; Albano *et al.*, 2012; Ismaili *et al.*, 2004; Zuzarte *et al.*, 2013).

Para o efeito foram selecionados dois modelo *in vitro*, representativos da inflamação periférica e central, utilizando respetivamente as linhas celulares de macrófagos (Raw 264.7) e microglia (BV2) estimulada com LPS, para avaliação do potencial efeito anti-inflamatório do óleo essencial de *T. zygis* subsp. *sylvestris* e seus compostos principais, *p*-cimeno, timol e carvacrol. O efeito do óleo e compostos principais na produção do mediador pró-inflamatório óxido nítrico, produzido em elevadas quantidades durante a resposta inflamatória, foi analisado através da quantificação de nitritos nos sobrenadantes das culturas celulares.

Uma vez que a avaliação da citotoxicidade de potenciais fitofármacos constitui uma etapa crucial antes da validação das biomoléculas para fins farmacêuticos/cosméticos/alimentares, neste estudo avaliou-se também a citotoxicidade do óleo essencial e seus compostos principais nas linhas celulares de macrófagos (Raw 264.7), microglia (BV2), queratinócitos (HacaT), hepatócitos (Hep G2) e epitélio pulmonar (A549), com o objetivo de identificar concentrações bioativas e seguras do óleo e seus compostos principais.

Os resultados dos testes efetuados na linha celular de macrófagos (Raw 264.7) com o óleo essencial de *T. zygis* subsp. *sylvestris* evidenciaram a diminuição de nitritos induzida por LPS nas concentrações de 0,64 e 0,32  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . Estas concentrações não apresentam citotoxicidade, o que demonstra uma boa atividade anti-inflamatória. Este estudo corrobora observações anteriores que demonstram que o extrato de *Thymus zygis* possui atividade anti-inflamatória por diminuir a produção de mediadores pró-inflamatórios, como TNF- $\alpha$  e IL-6 (Ocaña & Reglero, 2012). Os compostos principais *p*-cimeno, timol e carvacrol, apesar de evidenciarem uma diminuição da produção de nitritos para todas as concentrações testadas, apresentaram elevada citotoxicidade.

Os resultados do óleo essencial de *T. zygis* subsp. *sylvestris* em células de microglia (BV2), evidenciaram a diminuição da produção de nitritos para todas as concentrações estudadas. No entanto, apenas as concentrações de 0,16 e 0,08  $\mu\text{L/mL}$  apresentaram segurança toxicológica. Estes resultados sugerem que o *T. zygis* subsp. *sylvestris* poderá ter potencial terapêutico para o tratamento de doenças neurodegenerativas que são acompanhadas por ativação da microglia. Os compostos timol e carvacrol diminuíram a produção de nitritos, no entanto apresentaram elevada citotoxicidade; o *p*-cimeno demonstrou uma boa atividade anti-inflamatória nas concentrações de 0,16 e 0,08  $\mu\text{L/mL}$ .

O óleo essencial de *T. zygis* subsp. *sylvestris* não apresentou citotoxicidade nas linhas celulares de queratinócitos, hepatócitos e epitélio alveolar nas concentrações de 0,16 e 0,08  $\mu\text{L/mL}$ .

Relativamente aos compostos principais do óleo, nomeadamente o timol e carvacrol, detetou-se citotoxicidade em todas as linhas celulares testadas; o *p*-cimeno não demonstrou citotoxicidade nas concentrações de 0,16 e 0,08  $\mu\text{L/mL}$ . Estes resultados corroboram a citotoxicidade observada em células humanas intestinais (Caco-2) induzida por dois compostos principais do óleo essencial de oregão, o carvacrol e timol (Llana-Ruiz-Cabello et al., 2014).

Apesar de nesta investigação o carvacrol não ter apresentado atividade anti-inflamatória, outros estudos da literatura sugerem a sua potencial utilização em processos inflamatórios (Guimarães et al., 2012; Lima et al., 2013; Silva et al., 2012).

Estes resultados demonstram ainda que as propriedades biológicas do óleo essencial de *T. zygis* subsp. *sylvestris* são devidas à ação combinada dos seus diversos constituintes.

Em síntese, este estudo permitiu concluir que o óleo essencial de *T. zygis* subsp. *sylvestris* diminuiu significativamente a produção de óxido nítrico para as concentrações não citotóxicas (0,08 e 0,16  $\mu\text{L/mL}$ ) para os modelos celulares de microglia, queratinócitos, hepatócitos e células do epitélio alveolar. No modelo celular de macrófagos apresentou uma redução significativa do óxido nítrico sem se verificar citotoxicidade para as concentrações de 0,64 e 0,32  $\mu\text{L/mL}$ .

O carvacrol e timol apresentaram toxicidade para as linhas de macrófagos, microglia, queratinócitos, hepatócitos e células de epitélio alveolar.

O *p*-cimeno, apesar de apresentar toxicidade na linha celular de macrófagos, destaca-se pelo facto de reduzir significativamente a produção de óxido nítrico para as

concentrações não citotóxicas (0,16 e 0,08  $\mu\text{l/ml}$ ) em células da microglia, queratinócitos, hepatócitos e células do epitélio alveolar.

Com este trabalho demonstrou-se que o óleo essencial de *T. zygis* subsp. *sylvestris* e um dos compostos principais, o *p*-cimeno, representam uma fonte natural de novas moléculas anti-inflamatórias e sustentam investigações posteriores, que avaliem a sua eficácia em estratégias terapêuticas para o tratamento de doenças inflamatórias.

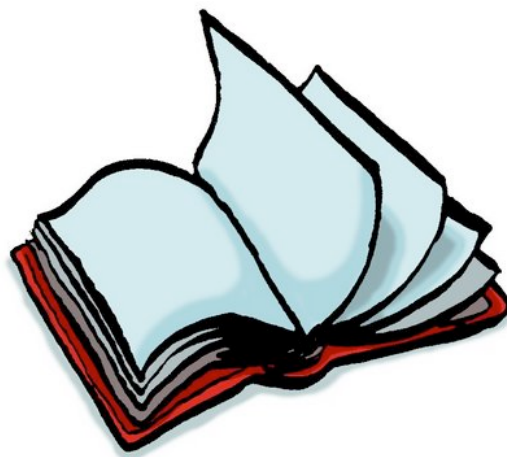


## **V- TRABALHOS FUTUROS**

O género *Thymus* é bastante utilizado em medicina tradicional. Tendo por base os resultados promissores obtidos no presente trabalho relativamente ao potencial anti-inflamatório do óleo essencial de *T. zygis* subsp. *sylvestris*, seria interessante:

- Testar o seu efeito noutros mediadores pró-inflamatórios;
- Avaliar o mecanismo molecular subjacente ao efeito anti-inflamatório;
- Avaliar a sua capacidade antioxidante;
- Validar o potencial anti-inflamatório em modelos *in vivo*.

## **VI- BIBLIOGRAFIA**



- Adams, M., Berset, C., Kessler, M., Hamburger, M. (2009). Medicinal herbs for the treatment of rheumatic disorders-a survey of European herbals from the 16th and 17th century. *Journal of Ethnopharmacology*, 121(3), 343–59.
- Albano, S. M., Lima, A. S., Miguel, M. G., Pedro, L. G., Barroso, G., Figueiredo, A. C. (2012). Antioxidant , Anti-5-lipoxygenase and Antiacetylcholinesterase Activities of Essential Oils and Decoction Waters of Some Aromatic Plants. *Rec. Nat. Prod.*, 1, 35–48.
- Albano, S. M., & Miguel, M. G. (2011). Biological activities of extracts of plants grown in Portugal. *Industrial Crops and Products*, 33 (2), 338–343.
- Ameh, S. J., Obodozie, O. O., Inyang, U. S., Abubakar, M. S., Garba, M. (2010). Current phytotherapy - A perspective on the science and regulation of herbal medicine. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4 (2), 72–81.
- Antunes, T., Sevinate-Pinto, I., Barroso, J. G., Cavaleiro, C., Salgueiro, L. R. (2004). Micromorphology of trichomes and composition of essential oil of *Teucrium capitatum*. *Flavour and Fragrance Journal*, 19 (4), 336–340.
- Arunasree, K. M. (2010). Anti-proliferative effects of carvacrol on a human metastatic breast cancer cell line, MDA-MB 231. *Phytomedicine : International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 17 (8-9), 581–8.
- Aruoma, O. I. (1998). Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75 (2), 199–212.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils- A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446–475.
- Ballester-Costa, C., Sendra, E., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J. a., Viuda-Martos, M. (2013). Chemical composition and *in vitro* antibacterial properties of essential oils of four *Thymus* species from organic growth. *Industrial Crops and Products*, 50, 304–311.
- Baser, K. H. C., & Demirci, F. (2007). Chemistry of essential oils. In R.G. Berger, ed., *Flavours and Fragrances – Chemistry, bioprocessing and sustainability*. Springer, Berlin, pp. 43–86.

- Bukovská, A., Cikos, S., Juhás, S., Il'ková, G., Rehák, P., Koppel, J. (2007). Effects of a combination of *thyme* and *oregano* essential oils on TNBS-induced colitis in mice. *Mediators of Inflammation*, 2007.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94 (3), 223–53.
- Chen, X., Lin, Z., Liu, A., Ye, J., Luo, Y., Luo, Y., Mao, X., Liu, P., Pi, R. (2010). The orally combined neuroprotective effects of sodium ferulate and borneol against transient global ischaemia in C57 BL / 6J mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 62, 915–923.
- Cowan, M. M. (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12 (4).
- Croteau, R., Kutchan, T. M., Lewis, N. G. (2000). Natural Products (Secondary Metabolites). In B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones, eds., *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD pp 1250-1318.
- Cruz, M. T., Duarte, C. B., Gonçalo, M., Figueiredo, A., Carvalho, P., Lopes, M. C. (2001). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor activates the transcription of nuclear factor kappa B and induces the expression of nitric oxide synthase in a skin dendritic cell line. *Immunology and Cell Biology*, 79 (6), 590–6.
- Dandlen, S. A., Lima, A. S., Mendes, M. D., Miguel, M. G., Faleiro, M. L., Sousa, M. J., Pedro, Luís G., Barroso, José G., Figueiredo, A. C. (2011). Antimicrobial activity , cytotoxicity and intracellular growth inhibition of Portuguese *Thymus* essential oils, 21 (6), 1012–1024.
- Darshan, S., & Doreswamy, R. (2004). Patented antiinflammatory plant drug development from traditional medicine. *Phytotherapy Research : PTR*, 18 (5), 343–57.
- Dewick, P. M. (2002). The biosynthesis of C5–C25 terpenoid compounds. *Natural Product Reports*, 19 (2), 181–222.
- Dubey, V. S., Bhalla R., Luthra R. (2003). Review An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. *Journal of Biosciences*, 28 (5), 637–646.



- Edris, A. E. (2007). Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents. *Phytother. Res.* 21, 308-323.
- Elless, M. P., Blaylock, M. J., Huang, J. W., Gussman, C. D. (2000). Plants as a natural source of concentrated mineral nutritional supplements. *Food Chemistry*, 71(2), 181–188.
- Fachini-Queiroz, F. C., Kummer, R., Estevão-Silva, C. F., Carvalho, M. D. D. B., Cunha, J. M., Grespan, R., Bersani-Amado, C, Cuman, R. K. N. (2012). Effects of Thymol and Carvacrol, Constituents of *Thymus vulgaris* L. Essential Oil, on the Inflammatory Response. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.
- Farmacopeia Portuguesa. (2005). *Farmacopeia Portuguesa*, 8 ed., Infarmed, Lisboa.
- Ferrero-Miliani, L., Nielsen, O. H., Andersen, P. S., Girardin, S. E. (2007). Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1beta generation. *Clinical and Experimental Immunology*, 147 (2), 227–35.
- Figueiredo, A. ., Barroso, J. G., Pedro, L. G. (2007). Plantas aromáticas e medicinais. Factores que afectam a produção. In A.C. Figueiredo, J.G. Barroso L.G. Pedro, eds. *Potencialidades e aplicações das plantas aromáticas e medicinais*. 3rd ed., pp. 1–18. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa – Centro de Biotecnologia Vegetal, Lisboa, Portugal.
- Figueiredo, A., Barroso, J. G., Pedro, L. G., Salgueiro, L., Miguel, M. G., Faleiro, M. L. (2008). Portuguese *Thymbra* and *Thymus* species volatiles: chemical composition and biological activities. *Current Pharmaceutical Design*, 14 (29), 3120–40.
- Folcarà, S. C., & Vanaclocha, B. (2000). Usos terapéuticos del tomillo. In *Revista de Fitoterapia*, 5–13.
- Garcia, E. C., & Solís, I. M. (2007). *Manual de Fitoterapia*. Barcelona, Espanha: Elsevier Masson.
- Gonçalves, M. J., Cruz, M. T., Cavaleiro, C., Lopes, M. C., Salgueiro, L. (2010). Chemical, antifungal and cytotoxic evaluation of the essential oil of *Thymus zygis* subsp. *sylvestris*. *Industrial Crops and Products*, 32 (1), 70–75.
- Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S., Tannenbaum, S. R. (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* 126, 131–138.

- Guimarães, A. G., Xavier, M., de Santana, M. T., Camargo, E., Santos, C., Brito, F., Barreto, E., Cavalcanti, S., Antonioli, A., Oliveira, R., Quintans-Júnior, L. J. (2012). Carvacrol attenuates mechanical hypernociception and inflammatory response. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 385 (3), 253–63.
- Gurib-Fakim, A. (2006). Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(1), 1–93.
- Inouye, S., Takizawa, T., Yamaguchi, H. (2001). Antibacterial activity of essential oils and their major constituents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47, 565–573.
- Ismaili, H., Milella, L., Fkih-Tetouani, S., Ildrissi, A., Camporese, A., Sosa, S., Altinier, G., Loggis, R., Aquino, R. (2004). In vivo topical anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of two extracts of *Thymus satureioides* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 91 (1), 31–6.
- Juhás, S., Cikos, S., Czikková, S., Veselá, J., Il'ková, G., Hájek, T., Domaracká, K., Domaracký, M., Bujnáková, D., Reháč, P., Koppel, J. (2008). Original Article Effects of Borneol and Thymoquinone on TNBS-Induced Colitis in Mice. *Folia Biologica*, 54, 1–7.
- Jukic, M., Politeo, O., Maksimovic, M., Milos, M., Milos, M. (2007). Properties of Thymol , Carvacrol and their Derivatives Thymoquinone and Thymohydroquinone. *Phytother Res.* 21, 259–261.
- Kamatou, G. P. P., & Viljoen, A. M. (2010). A Review of the Application and Pharmacological Properties of  $\alpha$ -Bisabolol and  $\alpha$ -Bisabolol-Rich Oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87 (1), 1–7.
- Karaman, S., Digrak, M., Ravid, U., Ilcim, A. (2001). Antibacterial and antifungal activity of the essential oils of *Thymus revolutus* Celak from Turkey. *Journal of Ethnopharmacology*, 76 (2), 183–6.
- Lawrence, B. M. (1995). The isolation of aromatic materials from natural plant products. In K. Tuley de Silva ed., *A manual on the essential oil industry. Proceedings of the 3rd UNIDO Workshop on Essential Oil and Aroma Chemical Industries*, 57–154.

- Lima, H., Kaplan, M., Cruz, A. (2003). Influência dos fatores abióticos na produção e variabilidade de terpenóides em plantas. *Floresta E Ambiente*, 10, 71–77.
- Lima, M. D. S., Quintans-Júnior, L. J., de Santana, W. A., Martins Kaneto, C., Pereira Soares, M. B., Villarreal, C. F. (2013). Anti-inflammatory effects of carvacrol: evidence for a key role of interleukin-10. *European Journal of Pharmacology*, 699 (1-3), 112–7.
- Liu, R., Zhang, L., Lan, X., Li, L., Zhang, T.-T., Sun, J.-H., Du, G.-H. (2011). Protection by borneol on cortical neurons against oxygen-glucose deprivation/reperfusion: involvement of anti-oxidation and anti-inflammation through nuclear transcription factor kappaB signaling pathway. *Neuroscience*, 176, 408–19.
- Llana-Ruiz-Cabello, M., Gutiérrez-Praena, D., Pichardo, S., Moreno, F. J., Bermúdez, J. M., Aucejo, S., Cameán, A. M. (2014). Cytotoxicity and morphological effects induced by carvacrol and thymol on the human cell line Caco-2. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 64, 281–90.
- Maestri, D. M., Nepote, V., Zygadlo, J. A. (2006). *Natural products as antioxidants*, Vol. 661, India, pp. 105–135.
- Mariutti, L., & Bragagnol, N. (2007). Review: Natural Antioxidants from the Lamiaceae Family . Application in Food. *Brazilian Journal of Food Technology*, 10, 96–103.
- Martínez, S., Madrid, J., Hernandez, F., Megías, M. D., Sotomayor, J. A., Jordan, M. J. (2006). Effect of thyme essential oils (*Thymus hyemalis* and *Thymus zygis*) and monensin on in vitro ruminal degradation and volatile fatty acid production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (18), 6598–602.
- McGarvey, D. J., & Croteau, R. (1995). Terpenoid metabolism. *The Plant Cell*, 7 (7), 1015–26.
- Miguel, M. G. (2010). Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. *Molecules*, 15 (12), 9252–87.
- Moldão-Martins, M., Bernando-Gil, M. G., Beirão da Costa, M. L., Rouzet, M. (1999). Seasonal variation in yield and composition of *Thymus zygis* L . subsp . *sylvestris* essential oil. *Flavour Frag. J.*, 14, 177–182.

- Moldão-Martins, M., Palavra, A., Beirão da Costa, M. L., Bernardo-Gil, M. G. (2000). Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of *Thymus zygis* L. subsp. *sylvestris* aroma. *Journal of Supercritical Fluids*, 18, 25–34.
- Morales, R. (1986). Taxonomia de los géneros *Thymus* (excluida la sección *Serpyllum*) y *Thymbra* en la Península Ibérica. *Ruiza*, 3, 1–324.
- Morales, R. (2002). The history botany and taxonomy of the genus *Thymus*. In *Thyme: The genus Thymus*. London: Taylor & Francis, pp. 1–43.
- Morales, R., Quintanar, A., Cabezas, F., Pujadas, A., Cirujano, S. (2010). Flora Ibérica- Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares, Vol. XII. Madrid, Espanha, pp. 348–408.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65 (1-2), 55–63.
- Naghibi, F., Mosaddegh, M., Motamed, S. M., Ghorbani, A. (2005). Labiatae Family in folk Medicine in Iran: from Ethnobotany to Pharmacology. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 63–79.
- Ocaña, A., & Reglero, G. (2012). Effects of Thyme Extract Oils (from *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis*, and *Thymus hyemalis*) on Cytokine Production and Gene Expression of oxLDL-Stimulated THP-1-Macrophages. *Journal of Obesity*.
- Orhan, I., Kartal, M., Kan, Y., Sener, B. (2008). Activity of essential oils and individual components against acetyl- and butyrylcholinesterase. *Journal of Biosciences*, 63 (7-8), 547–53.
- Pina-Vaz, C., Gonçalves Rodrigues, A., Pinto, E., Costa-de-Oliveira, S., Tavares, C., Salgueiro, L., Cavaleiro, C., Palmeira, A., Rodrigues, A., Martinez-de-Oliveira, J. (2004). Antifungal activity of *Thymus* oils and their major compounds. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 18, 73–78.
- Pinto, E., Pina-Vaz, C., Salgueiro, L., Gonçalves, M. J., Costa-de-Oliveira, S., Cavaleiro, C., Gonçalves, M.J., Martinez-de-Oliveira, J. (2006). Antifungal activity of the essential oil of

- Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *Journal of Medical Microbiology*, 55, 1367–73.
- Proença da Cunha, A., Cavaleiro, C., Salgueiro, L. (2010). Fármacos Aromáticos (Plantas Aromáticas e Óleos essenciais. Fundação Calouste Gulbenkian, *Farmacognosia e Fitoquímica*. Lisboa, p. 670.
- Proença da Cunha, A., Ribeiro, J., Roque, O. (2007). *Plantas Aromáticas em Portugal. Caracterização e Utilizações*. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, p. 328.
- Proença da Cunha, A., Roque, O., Gaspar, N. (2011). *Cultura e utilização das plantas medicinais e aromáticas*. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, p. 472.
- Proença da Cunha, A., Roque, O., Nogueira, M. (2012). *Plantas aromáticas e óleos essenciais composição e aplicações*. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa. p. 678.
- Rasooli, I., & Mirmostafa, S. A. (2003). Bacterial susceptibility to and chemical composition of essential oils from *Thymus kotschyanus* and *Thymus persicus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (8), 2200–5.
- Rates, S. M. K. (2001). Plants as source of drugs. *Toxicon*, 39, 603–613.
- Reichling, J., Schnitzler, P., Suschke, U., Saller, R. (2009). Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties-an overview. *Forschende Komplementärmedizin*, 16 (2), 79–90.
- Riella, K. R., Marinho, R. R., Santos, J. S., Pereira-Filho, R. N., Cardoso, J. C., Albuquerque-Junior, R. L. C., Thomazzi, S. M. (2012). Anti-inflammatory and cicatrizing activities of thymol, a monoterpene of the essential oil from *Lippia gracilis*, in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, 143 (2), 656–63.
- Rota, M. C., Herrera, A., Martínez, R. M., Sotomayor, J. A., Jordán, M. J. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control*, 19 (7), 681–687.
- Sadeghi, I., Yousefzadi, M., Behmanesh, M., Sharifi, M., Moradi, A. (2013). In vitro Cytotoxic and Antimicrobial Activity of Essential Oil From *Satureja Intermedia*. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 15 (1), 70–4.

- Sáez, F. (1995). Essential oil variability of *Thymus zygis* growing wild in Southeastern Spain. *Phytochemistry*, 40 (3), 819–825.
- Salas, J. B., Téllez, T., Pardo, V., Capdevila, M., Pérez-Alonso, M., Rodríguez, C. (2012). Short communication . Influence of phenological stage on the antioxidant activity of *Thymus zygis* s . l . essential oil. *Spanish Journal of Agricultural Research* 10 (2), 461–465.
- Salgueiro, L. (1994). *Os tomilhos portugueses e os seus óleos essenciais. Tese de Doutoramento.* Universidade de Coimbra.
- Salgueiro, L. (2007). Os tomilhos de Portugal. In A.C. Figueiredo, J.G. Barroso, L.G. Pedro, eds. *Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais- Curso Teórico-Prático.* 3rd ed., pp. 48–54. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa – Centro de Biotecnologia Vegetal, Lisboa, Portugal.
- Saravanakumar, M., Manivannan, J., Sivasubramanian, J., Silambarasan, T., Balamurugan, E., Raja, B. (2012). Molecular metabolic fingerprinting approach to investigate the effects of borneol on metabolic alterations in the liver of nitric oxide deficient hypertensive rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 362 (1-2), 203–9.
- Silva, F. V., Guimarães, A. G., Silva, E. R. S., Sousa-Neto, B. P., Machado, F. D. F., Quintans-Júnior, L. J., Arcanjo, D., Oliveira, F., Oliveira, R. C. M. (2012). Anti-inflammatory and anti-ulcer activities of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of oregano. *Journal of Medicinal Food*, 15 (11), 984–91.
- Silveira e Sá, R., Andrade, L., Oliveira, R., Sousa, D. (2014). A review on anti-inflammatory activity of phenylpropanoids found in essential oils. *Molecules*, 19 (2), 1459–80.
- Silveira e Sá, R., Andrade, L., Sousa, D. (2013). A review on anti-inflammatory activity of monoterpenes. *Molecules*, 18 (1), 1227–54.
- Simões, C., Sckenkel, E., Gosmann, G., Mello, J., Mentz, L., Petrovick, P. (1999). *Farmacognosia da planta ao medicamento*, 1º edição UFSC.
- Stahl-Biskup, E., & Saez, F. (2002). *Thyme. In: The genus Thymus.* T. & Francis, ed., London, p. 331.

- Svoboda, K. P., & Svoboda, T. G. (2000). *Secretory structures of aromatic and medicinal plants*. Microscopix Publications. Knighton, UK.
- Tak, P. P., & Firestein, G. S. (2001). NF- $\kappa$ B: a key role in inflammatory diseases. *Journal of Clinical Investigation*, 107 (1), 7–11.
- Tappin, M. R. R., Pereira, J. F. G., Lima, L. A., Siani, A. C., Mazzei, J. L., Ramos, M. F. (2004). Análise química quantitativa para a padronização do óleo de copaíba por cromatografia em fase gasosa de alta resolução. *Quimica Nova*, 27 (2), 236–240.
- Tolonen, A. (2003). *Analysis of secondary metabolites in plant and cell culture tissue of Hypericum perforatum L and Rhodiola Rosea L*. Department of Chemistry, University of Oulu, Oulu.
- Trapp, S. C., & Croteau, R. B. (2001). Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications. *Genetics*, 158 (2), 811–32.
- Tsai, M.-L., Lin, C.-C., Lin, W.-C., Yang, C.-H. (2011). Antimicrobial, Antioxidant, and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils from Five Selected Herbs. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 75 (10), 1977–1983.
- Vigo, E., Cepeda, A., Gualillo, O., Perez-Fernandez, R. (2004). In-vitro anti-inflammatory effect of Eucalyptus globulus and Thymus vulgaris: nitric oxide inhibition in J774A.1 murine macrophages. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 56 (2), 257–63.
- Vladimir-knezevic, S., Blazeković, B., Kindl, M., Vladić, J., Lower-Nedza, A., Brantner, A. (2014). Acetylcholinesterase Inhibitory, Antioxidant and Phytochemical Properties of Selected Medicinal Plants of the Lamiaceae Family. *Molecules*, 19, 767–782.
- Youdim, K. a, & Deans, S. G. (1999). Dietary supplementation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil during the lifetime of the rat: its effects on the antioxidant status in liver, kidney and heart tissues. *Mechanisms of Ageing and Development*, 109 (3), 163–75.
- Yu, H., Zhang, Z.-L., Chen, J., Pei, A., Hua, F., Qian, X., He, J., Liu, C., Xu, X. (2012). Carvacrol, a food-additive, provides neuroprotection on focal cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. *PLoS One*, 7 (3).
- Zuzarte, M., Gonçalves, M. J., Canhoto, J., Salgueiro, L. (2011). Antidermatophytic activity of essential oils. *Formatex*, 1167–1178.

- Zuzarte, M., Gonçalves, M. J., Cavaleiro, C., Cruz, M. T., Benzarti, A., Marongiu, B., Maxia, A., Piras, A., Salgueiro, L. (2013). Antifungal and anti-inflammatory potential of *Lavandula stoechas* and *Thymus herba-barona* essential oils. *Industrial Crops and Products*, 44, 97–103.
- Zwenger, S., & Basu, C. (2008). Plant terpenoids: applications and future potentials. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, 3(1), 1–7.