UNIVERSIDADE
DE TRÁS-OS-MONTES
E ALTO DOURO

VALORIZAÇÃO DE PLANTAS AROMÁTICAS E MEDICINAIS PELAS PROPRIEDADES BIOATIVAS DOS SEUS COMPONENTES

Sumário pormenorizado da Lição de Síntese, no âmbito de provas de agregação em Ciências Químicas e Biológicas, ramo Ciências Biológicas

3º ciclo/Programa Doutoral *AgriChains*, integrado na Unidade Curricular Seminário I

AMÉLIA MARIA LOPES DIAS DA SILVA

Vila Real

Fevereiro de 2021

UNIVERSIDADE
DE TRÁS-OS-MONTES
E ALTO DOURO

VALORIZAÇÃO DE PLANTAS AROMÁTICAS E MEDICINAIS PELAS PROPRIEDADES BIOATIVAS DOS SEUS COMPONENTES

Sumário pormenorizado da Lição de Síntese, no âmbito de provas de agregação em Ciências Químicas e Biológicas, ramo Ciências Biológicas

3º ciclo/Programa Doutoral AgriChains, integrado na Unidade Curricular Seminário I

AMÉLIA MARIA LOPES DIAS DA SILVA

Professor Auxiliar do Departamento de Biologia e Ambiente, Escola de Ciências da Vida e Ambiente, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Vila Real

Fevereiro de 2021

Sumário pormenorizado da Lição de Síntese, elaborado para efeitos de prestação de provas para obtenção do título académico de agregado em Ciências Químicas e Biológicas, Especialidade em Ciências Biológicas, a que se refere a alínea e) do artigo 4º do Regulamento 657/2016 publicado em Diário da República, Série II, nº 133, a 13 de Julho de 2016, para a obtenção do título de Agregado pela Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, de acordo com o Decreto-Lei n.º 239/2007, de 19 de Junho.

CONTEÚDO

1. Enquadramento 1
2. Plano da Lição. 3
3. Desenvolvimento da Lição. 5
3.1. Plantas aromáticas e medicinais: fonte de moléculas bioativas. 5
3.2. Plantas do género *Thymus* L. em Portugal. 7
3.3. Correlação entre as principais componentes bioativas de algumas espécies de *Thymus* com as suas propriedades nutracêuticas 9
3.3.1. Principais moléculas bioativas analisadas nestas plantas 10
3.3.2. Atividade antioxidante e sua relevância a nível celular 13
3.3.3. Atividade anti-proliferativa / citotóxica 16
3.3.4. Atividade anti-inflamatória 18
3.3.5. Atividade antidiabética, neuro-protetora e anti-envelhecimento 21
4. Considerações Finais 23
5. Bibliografia 24

1. ENQUADRAMENTO

O tema desta Lição de Síntese, "VALORIZAÇÃO DE PLANTAS AROMÁTICAS E MEDICINAIS PELAS PROPRIEDADES BIOATIVAS DOS SEUS COMPONENTES", enquadra-se na Unidade Curricular (UC) Seminário I, do Programa Doutoral AgriChains (*Diário da República, 2.ª série, N.º 61, de 27 de março de 2015*), da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD). O Programa Doutoral AgriChains (Cadeias de Produção Agrícola – da mesa ao campo; *Agricultural Production Chains – From Fork to Farm*) é um curso de 3º ciclo, acreditado pela A3Es e financiado pela FCT, encontra-se ancorado no Centro de Investigação e Tecnologias Agroambientais e Biológicas (CITAB) e conta com a participação de vários docentes/investigadores de vários departamentos da UTAD, afetos ao CITAB e ao Centro de Química – Vila Real (centro de investigação que também suporta este Programa Doutoral). A UC Seminário I, é anual, tem um esforço de 6 ECTS, funciona no 1º ano curricular do curso, com 162 h de trabalho sendo 64 h de contacto na tipologia seminário (S), nas áreas científicas: Biologia e Bioquímica (BB), Indústrias Alimentares (IA), Produção Agrícola e Animal (PAA) e Ciências da Terra (CT), de acordo com a Portaria 256/2005 de 16 de Março e o Regulamento do curso[1]. A candidata é a regente desta UC, desde a criação deste ciclo de estudos. Pelo que organizou e estruturou a UC e articula com os estudantes o plano que melhor se adequa à sua formação, de acordo com os objetivos individuais do estudante enquadrados na UC, dado que este ciclo de estudos é de formato variável e adequado a cada estudante.

Dentro dos objetivos da UC de Seminário I, pretende-se que os estudantes:

1) **Adquiram ou aprofundem conhecimentos em assuntos relacionados com as cadeias de produção agro-alimentar, desde a produção agrícola até à validação da qualidade nutricional e efeitos na saúde humana**.

2) Adquiram conhecimentos fundamentais para a comunicação em ciência e a nível empresarial, para assegurar uma elevada capacidade de adaptação a novas e complexas situações bem como um trabalho multidisciplinar, quer a nível nacional quer global.

3) Adquiram ferramentas para divulgar ciência e conhecimento científico.

[1] https://dre.pt/application/file/a/73416399

4) Compreendam o papel das cadeias de produção agrícola num contexto socioeconómico.

5) Participem na discussão de assuntos científicos relacionados com cadeias de produção agrícola, que aumentem a aptidão para solucionar novos desafios tornando-se mais competentes e competitivos no ambiente extrauniversitário.

De forma a satisfazer os objetivos desta UC (em particular ao objetivo 1), esta Lição, no formato de seminário, tem como objetivo apresentar aos estudantes:

i) Um tema transversal às várias áreas do ciclo de estudos; enquadrando a área de produção de plantas aromáticas e medicinais (PAMs) e sua relevância socioeconómica, com a área das Ciências Biológicas através de estudos dos efeitos destas na saúde humana. Realçando a importância da produção de plantas em ambiente sustentável e a proteção de espécies endémicas e ameaçadas.

ii) Metodologias para a avaliação e validação de componentes bioativos, como ferramentas para a categorização de plantas em alimentos funcionais e/ou fontes de moléculas bioativas com propriedades nutracêuticas.

iii) Alguns modelos biológicos, essencialmente *in vitro* (modelos celulares e enzimáticos), para estudar a correlação entre a composição fitoquímica, destas plantas, em moléculas bioativas, e os potenciais efeitos na saúde, evidenciando o efeito modulador destas moléculas em vias celulares específicas.

Esta foi uma escolha muito ponderada, atendendo a que muitas outras escolhas poderiam ter sido possíveis, no âmbito desta ou de outras Unidades Curriculares. Contudo, uma razão da escolha deste tema para a Lição de Síntese teve em conta a experiência científica e técnica que a candidata tem adquirido nestas áreas ao longo do seu percurso académico e científico, aliada ao facto de ser um tema inserido na sua área de investigação pelo que pode partilhar alguns dos seus resultados de investigação. Aliado ainda ao facto deste tema se inserir num dos objetivos da UC de Seminário I que visa aliar a produção de plantas (ou estimular a produção de determinadas plantas) pelas suas propriedades bioativas, com vista a introduzi-las na alimentação para promover benefícios na saúde Humana.

A estrutura desta Lição de Síntese encontra-se sumariada na secção 2, na secção 3 será feito o seu desenvolvimento e na secção 4 será apresentada a bibliografia de apoio.

2. PLANO DA LIÇÃO.

A presente Lição de Síntese inicia-se com uma breve introdução, onde se irá fazer uma abordagem às plantas aromáticas e medicinais (PAMs) de utilização mais comum, salientando a importância dos estudos etnobotânicos e etnofarmacológicos para a descoberta de fármacos. Dirigindo depois o foco para as plantas da família Lamiaceae, em particular aquelas que são usadas na alimentação humana, nas suas várias formas desde plantas verdes a condimentos e infusões. Será feita também uma breve abordagem à sua grande relevância na cultura das civilizações, como fonte de alimentos e "medicamentos". Esta abordagem ocupará no máximo 5 minutos.

De seguida, a Lição foca-se nas plantas do género *Thymus* L., fazendo uma breve abordagem à importância socioeconómica destas plantas, contextualizando-a na realidade da Europa, Península Ibérica, e em particular de Portugal. Será feita uma breve alusão às espécies endémicas da Península Ibérica, sua utilização e comercialização, indicando as espécies endémicas de Península Ibérica, e em particular de Portugal, salientando as que estão ameaçadas de extinção, segundo a União Internacional para Conservação da Natureza (UICN ou IUCN). Esta abordagem ocupará no máximo 10 minutos.

A componente principal desta Lição de Síntese, centra-se na correlação entre as componentes bioativas de algumas plantas do género *Thymus* com as propriedades nutracêuticas, avaliadas com recursos a estudos *in vitro*. Neste tópico serão indicadas as principais moléculas bioativas (e.g., compostos fenólicos, terpenos) presentes nas plantas em estudo. Serão abordados os principais resultados científicos relativos a atividades biológicas, avaliadas com recurso a sistemas *in vitro* (e.g. *scavenging* de radicais livres, atividade de enzimas e células em cultura), tais como:

i) Antioxidante (resultante da atividade de *scavenging* de radicais livres);

ii) Anti-proliferativa e/ou citotóxica, usando modelos de células animais;

iii) Anti-inflamatória, usando modelos celulares;

iv) Antidiabética, usando modelos enzimáticos de enzimas relevantes na digestão de hidratos de carbono e que modulam a taxa de absorção de glicose.

v) Neuro-protetora e anti-envelhecimento, usando ensaios de inibição enzimática.

Será feita uma correlação entre atividade biológica, moléculas bioativas e possível validação destas como alimentos funcionais ou fonte de moléculas bioativas para as indústrias farmacêuticas, de cosmética, ou alimentares. Nesta secção será feita apresentação e discussão de alguns resultados obtidos na nossa investigação mais recente. Esta abordagem ocupará no máximo 40 minutos.

Considerações finais: esta secção ocupará no máximo 5 minutos.

Ao longo de toda a Lição de Síntese, serão usados esquemas, tabelas e figuras para ilustrar os conceitos apresentados, bem como para apresentar os resultados obtidos da investigação. A maior parte destes auxiliares não será incluída na secção seguinte, onde somente algumas tabelas serão incluídas de forma a resumir a informação, que se pretende sumária.

3. DESENVOLVIMENTO DA LIÇÃO.

3.1. PLANTAS AROMÁTICAS E MEDICINAIS: FONTE DE MOLÉCULAS BIOATIVAS.

A utilização de plantas aromáticas e medicinais (PAMs) é transversal às várias civilizações e populações. Desta utilização, ao longo dos tempos, acumulou-se conhecimento popular sobre os seus benefícios e as suas aplicações alimentares e medicinais. De salientar que, até meados do século XIX, as principais fontes de agentes terapêuticos utilizadas pelos seres humanos, eram plantas. Atualmente, cerca de 80% da população ainda depende de "medicamentos" com origem botânica (Sen and Samanta 2015). Os conhecimentos etnobotânicos, o seu reconhecimento como ciência, a promoção de expedições etnobotânicas por parte de instituições, como a Organização Mundial de Saúde (OMS), e de empresas farmacêuticas, constituíram uma ferramenta de investigação que permitiu descobertas importantes, tais como: metformina (da arruda-caprária; *Galega officinalis* L.); quinina (de cinchona; género *Cinchona* L.), salicilatos (da casca de salgueiro; *Salix alba* L.), o taxol/paclitaxel (do teixo; *Taxus brevifolia* Nutt.), e de muitas outras tão relevantes como estas (Sen and Samanta 2015, Atanasov et al. 2015). Apesar dos estudos etnobotânicos serem comuns em muitas partes do mundo, na Península Ibérica não há registo de estudos anteriores a 1980, e em Portugal os estudos, seguindo as normas etnobotânicas, são escassos até 2000 (Camejo-Rodrigues et al. 2003), não obstante haver vários relatos de propriedades medicinais de várias plantas. Atualmente há registo de vários estudos etnobotânicos e etnofarmacológicos relativos à flora portuguesa (e.g. (Silva, Silva, Silva, et al. 2019, Camejo-Rodrigues et al. 2003, Neves et al. 2009)) e o Instituto da Conservação da Natureza tem promovido e estimulado a coleção desse conhecimento. Contudo, a evidência científica dos atributos etnofarmacológicos, para a maioria das plantas endémicas da flora portuguesa, ainda é escasso, apesar do grande interesse que este assunto tem vindo a despertar a uma parte da comunidade académica/científica. Do ponto de vista da candidata, a evidência científica de atributos bioativos, também constitui uma ferramenta para a preservação e incentivo à produção das respetivas espécies.

Na Europa, dos mais de 30 mil taxa de plantas identificados, distribuídos por cerca de 222 famílias, só cerca de 400 (distribuídos por cerca de 90 famílias) têm

atributos medicinais (Allen et al. 2014, Euro+Med 2006-2018). A tabela 1 apresenta alguns exemplos de plantas aromáticas e medicinais comuns, da flora Europeia, usadas comummente, salientando algumas das suas aplicações.

Tabela 1. Exemplos de plantas da flora Europeia usadas pelos seus atributos medicinais. Indica-se a família, a espécie (designação taxonómica e o nome comum) e algumas das suas utilizações.

Família	**Espécie, exemplos**	**Utilização**
Asteraceae	*Artemisia granatensis* Boiss. (camomila real)	Infusões, propriedades digestivas (1)
Hypericaceae	*Hypericum perforatum* L. (Erva de São João, ou Hipericão)	Infusões, diurético, para tratamento de problemas intestinais e depressão e outros transtornos do humor (2)
Lamiaceae	*Lavandula angustifolia* Mill. (Lavanda ou alfazema)	Infusões e EOs: calmante, antioxidante, antimicrobiano, (3)
	Mentha x *piperita* L. (Hortelã-pimenta ou hortelã hibrida)	Infusões e EOs: descongestionante nasal, digestivo, antimicrobiano, antiviral, analgésico, entre outros (4)
	Melissa officinalis L. (Erva-cidreira)	Infusões e EOs: calmante, digestiva, antiespasmódica, … (3).
	Ocimum basilicum L. (Manjericão)	Infusões e EOs: antimicrobiano, anticonvulsivo, antioxidante… (5)
	Origanum vulgare L. (Orégão)	Infusões e EOs: antimicrobiano, anti-inflamatório, analgésico, expetorante … (6)
	Rosmarinus officinalis L. (Alecrim)	Infusões e EOs: antimicrobiano, anti-inflamatório, analgésico, antioxidante… (6)
	Salvia officinalis L. (Sálvia)	Infusões e EOs: antioxidante, anti-inflamatório, anticancerígeno… (7)
	Thymus vulgaris L. (Tomilho comum)	Infusões e EOs: Digestivo, antioxidante, anti-inflamatório… (8)
Laureaceae	*Laurus nobilis* L. *(*Louro)	Infusões e EOs: antisséptico, digestivo, … (9).

Abreviaturas: OEs, óleos essenciais. Referências e notas: (1) Planta endémica da Serra Nevada em risco de extinção (Barrero et al. 2013). (2) Planta abundante na flora da Europa, Ásia e norte de África (Greeson, Sanford, and Monti 2001). (3) (Renata and Krzysztof 2014). (4) (McKay and Blumberg 2006). (5) (Joshi 2014). (6) (Carbone et al. 2018). (7) (Zaccardelli et al. 2020). (8) (Taghouti, Martins-Gomes, et al. 2020b). (9) (Sampaio et al. 2017).

As plantas aromáticas e medicinais de utilização mais comum na Europa distribuem-se por várias famílias (cerca de 90). Devido às suas propriedades aromáticas, em parte devidas à natureza dos seus óleos essenciais, são amplamente usadas em culinária, onde se destaca a cozinha mediterrânica, associando o efeito terapêutico com as características sensoriais (gustativa e olfativa). Contudo, estas plantas têm uma grande importância socioeconómica, dado que são vastamente usadas, para extração de óleos essenciais, para as indústrias farmacêuticas, cosméticas e alimentares, e cultivadas

para a comercialização em verde ou após secagem, para preparação de infusões e condimentos.

3.2. PLANTAS DO GÉNERO *THYMUS* L. EM PORTUGAL.

O género *Thymus* (comummente conhecido por tomilho), família Lamiaceae, contém mais de 300 espécies que são maioritariamente nativas da Europa Ocidental, apresentando uma grande dispersão na região do Mediterrâneo. Na flora Portuguesa estão descritas 12 espécies, sendo que 5 ainda estão divididas em subespécies (Euro+Med 2006-2018). Na medicina popular (e segundo registos etnofarmacológicos), as espécies de *Thymus* têm muitas propriedades medicinais (e.g. anti-helmínticas, expetorantes, antissépticas, antifúngicas, antimicrobianas, antioxidantes, antivirais, anti-inflamatórias), sendo comummente utilizadas na preparação de infusões, cataplasmas, etc. Estas plantas são também vastamente usadas como condimento, especialmente na culinária mediterrânica (Leal et al. 2017).

De salientar que entre as várias espécies de *Thymus* encontradas em Portugal algumas, como *Thymus citriodorus* (Pers.) Schreb. e *Thymus pulegioides* L., são espécies que ocorrem em toda a Europa, independentemente de as condições climáticas serem muito diferentes; outras espécies são nativas da Península Ibérica, e.g. *Thymus mastichina* L. e *Thymus zygis* L. (& Marrocos), e também endémicas a essas regiões. De entre as espécies endémicas, Portugal possui pelo menos 3 espécies classificadas na Lista-Vermelha (*Red List*) da IUCN (União Internacional para a Conservação da Natureza; www.iucnredlist.org), como espécies quase-ameaçadas de extinção, como seja o *Thymus carnosus* Boiss. (Balao et al. 2011), conhecido por tomilho das praias (endémica de Portugal, da Serra da Arrábida, costa Vicentina e Algarve; e de Espanha, zona de Huelva), o *Thymus camphoratus* Hoffmanns. & Link (Bilz 2011), conhecido por tomilho do mar (endémica de Portugal; costa Vicentina), e o *Thymus capitellatus* Hoffmanns. & Link (Carapeto et al. 2017), conhecido por tomilho-do-mato (endémica de Portugal; da região da Serra da Arrábida), por terem um habitat restrito e este estar a sofrer pressões antropogénicas devido à expansão urbana e turística. Há ainda outra espécie, o *Thymus albicans* Hoffmanns. & Link, considerada vulnerável, pelo facto de o número de indivíduos da espécie estar a decrescer.

Pelo exposto, algumas espécies de *Thymus* suscitaram interesse, pela sua distribuição geográfica (restrita) e/ou utilização, e ainda pela falta de conhecimento relativo às suas moléculas bioativas e potenciais bioatividades. Espécies, tais como *T. citriodorus*, *T. mastichina*, *T. pulegioides*, *T. zygis* (subsp. *zygis*, a subespécie endémica de Portugal), são utilizadas e comercializadas como infusões, xaropes ou outras preparações; o *T. vulgaris* é muito usado na culinária mas também em preparações medicinais (Silva et al. 2020, Taghouti, Martins-Gomes, et al. 2020a). Outras, espécies, como o *T. carnosus*, precisam de urgente intervenção para não serem extintas e o conhecimento científico das suas características e propriedades pode contribuir para a sua preservação.

Dos vários estudos, disponíveis na literatura científica, ressaltam particularidades na composição dos extratos (obtidos por diferentes métodos e com vários solventes ou combinações de solventes) em fitoquímicos, quer nas respetivas bioatividades, que demonstram as diferentes potencialidades destas espécies de *Thymus*, com propriedades nutracêuticas e como alimentos funcionais. E, ao mesmo tempo salienta as diferenças entre espécies. A transferência deste conhecimento constitui uma mais-valia para que entidades competentes pensem em investir na sua produção e preservação.

3.3. CORRELAÇÃO ENTRE AS PRINCIPAIS COMPONENTES BIOATIVAS DE ALGUMAS ESPÉCIES DE *THYMUS* COM AS SUAS PROPRIEDADES NUTRACÊUTICAS

Nesta secção dar-se-á ênfase a resultados de investigação em que a candidata esteve envolvida, que serão comparados e complementados com dados de outros trabalhos científicos da área (de outros investigadores). Serão escolhidas, essencialmente, as seguintes espécies do género *Thymus*: *T. carnosus*, *T. citriodorus*, *T. mastichina*, *T. pulegioides, T. zygis* subsp. *zygis* e *T. vulgaris,* cujas taxonomias estão bem descritas na literatura. Serão também incluídos resultados de tomilho-laranja, designado por *Thymus fragrantissimus*, dado que esta espécie, que se julga um hibrido do *T. vulgaris*, começa a ser introduzida na alimentação como condimento. A Figura 1 mostra fotos destas espécies em floração.

T. carnosus

T. x *citriodorus*

T. mastichina

T. pulegioides

T. zygis subsp. *zygis*

Thymus vulgaris

Tomilho-laranja

Figura 1. Espécies de tomilhos usados na preparação de infusões, xaropes ou na culinária. Todas as espécies, com exceção do tomilho-laranja podem ser encontradas no jardim botânico da UTAD. (Fotos obtidas na altura da floração e de colheita das mesmas, na UTAD ou na Ervital, pelos elementos do Laboratório de Biologia e Bioquímica Celular).

3.3.1. PRINCIPAIS MOLÉCULAS BIOATIVAS ANALISADAS NESTAS PLANTAS

Uma forma de analisar as componentes bioativas é através da extração química usando solventes e subsequente caracterização dos extratos. Com o objetivo de estudar efeitos bioativos na saúde humana, optou-se por mostrar resultados de extração aquosa, que mimetiza as moléculas extraídas durante a preparação de uma infusão, tisana ou mesmo as eluídas no suco digestivo, quando as plantas são ingeridas na forma de alimento. Por outro lado, conhecer o perfil fitoquímico da planta, através de uma extração exaustiva, permite-nos avaliar o potencial farmacológico da planta e a sua possível utilização como fonte de moléculas para as indústrias farmacêutica, cosmética e alimentar.

Assim, nesta Lição de Síntese, irão ser apresentados resultados obtidos da análise de extratos obtidos pelos seguintes métodos de extração:

i) Decocção com água (AD), para extrair os componentes hidrossolúveis, i.e. aqueles que estão potencialmente bio-disponíveis quando um indivíduos ingere estas plantas (como "chá"/infusão/tisana ou condimento);

ii) Extração exaustiva, usando uma mistura hidro-etanólica (HE, 20:80), de forma a remover praticamente todos os fitoquímicos da planta, permitindo a caracterização do conteúdo em fitoquímicos da mesma.

Da caracterização dos extratos, por métodos *in vitro* e por HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência) e LC-MS (cromatografia líquida associada a espectrometria de massa), destaca-se o ácido rosmarínico que está presente em todas as espécies estudadas, como composto maioritário, com exceção do *T. carnosus* que apresenta como compostos maioritários ácidos salvianólicos. O ácido rosmarínico e seus derivados oferecem uma ampla gama de bioatividades, cientificamente comprovadas, como antioxidantes, anti-proliferativos, anti-inflamatória, anti-angiogénica, antimicrobianos e outras (como resumido (Martins-Gomes, Nunes, et al. 2019)). A Tabela 2 apresenta um sumário dos principais compostos bioativos, com destaque para compostos fenólicos maioritários e para os dois terpenos estudados, dada a sua importância na modulação de algumas vias celulares.

Tabela 2: Lista dos principais fitoquímicos encontrados em algumas espécies de *Thymus*. Indicam-se os polifenóis maioritários e os dois triterpenóides analisados.

		mg / g de extrato		
Espécie	**Composto**	**AD**	**HE**	**REF**
T. carnosus	Isómero do ácido salvianólico A	27,5±3,2	67,3±2,2	(Martins-Gomes et al. 2018)
	Ácido salvianólico K	12,5±2,8	38,5±7,2	
	Ácido rosmarínico	4,4±0,05	29,1±1,0	
	Ácido ursólico	-	75,2±20,2	
	Ácido oleanólico	-	39,4±4,1	
T. citriodorus	Ácido rosmarínico	51,8±1,86	86,2±13,9	(Taghouti, Martins-Gomes, et al. 2020a)
	Ácido salvianólico I	-	25,9±3,9	
	Isómero do ácido salvianólico A	11,9±0,9	8,3±0,62	
	Luteolina-(?)-*O*-hexuronide	17,3±3,1	13,2±0,4	
	Ácido ursólico	-	-	
	Ácido oleanólico	-	-	
T. mastichina	Ácido rosmarínico	33,8±11,5	58,1±6,7	(Taghouti, Martins-Gomes, Schäfer, et al. 2020)
	Isómero do ácido salvianólico A	18,6±5,7	30,5±3,0	
	Luteolina-(?)-*O*-hexoside	9,3±3,2	20,8±4,1	
	Ácido ursólico	-	-	
	Ácido oleanólico	-	-	
T. pulegioides	Ácido rosmarínico	58,5±10,7	151,9±10,8	(Taghouti et al. 2018)
	Luteolina-(?)-*O*-hexuronide	39,9±2,5	60,8±7,0	
	Eriodictyol-(?)-*O*-hexuronide	19,6±3,2	26,8±4,1	
	Chrysoeriol-(?)-*O*-hexuronide	23,5±3,2	16,0±0,7	
	Ácido ursólico	-	3,9±2,5	
	Ácido oleanólico	-	1,5±0,2	
T. zygis subsp. *zygis*	Ácido rosmarínico	14,1±2,6	48,7±5,3	(Silva et al. 2020)
	Luteolina-(?)-*O*-hexoside	14,2±1,0	19,5±5,3	
	Ácido salvianólico I	3,2±0,7	14,5±2,1	
	Luteolina-(?)-*O*-hexuronide	10,1±1,1	12,8±1,4	
	Ácido ursólico	-	2,2±0,4	
	Ácido oleanólico	-	1,0±0,2	
T. vulgaris	Ácido rosmarínico	22,9±9,5	90,5±7,8	(Taghouti, Martins-Gomes, et al. 2020a)
	Ácido salvianólico I	-	11,6±0,9	
	Luteolina-(?)-*O*-hexuronide	15,7±1,5	17,8±2,0	
	Salvianolic acid K	3,7±0,9	6,5±0,8	
	Ácido ursólico	-	-	
	Ácido oleanólico	-	-	

Tomilho-laranja	Ácido rosmarínico	41,6±2,94	101,5±2,93	(*)
	Luteolina-(?)-*O*-hexuronide	24,5±1,77	30,90±4,60	
	Eriodictiol-(?)-*O*-hexorunide	6,12±0,57	4,09±0,74	
	Salvianolic acid K	3,10±0,16	2,81±0,12	
	Ácido ursólico	-	-	
	Ácido oleanólico	-	-	

(*) Valores experimentais obtidos como resultado de investigação da candidata, ainda não publicados, mas de acordo com os de Afonso et al. (2018).

De salientar que, de entre os fitoquímicos descritos nestas espécies de *Thymus*, ao contrário de outras espécies do género *Thymus*, os extratos de *T. mastichina* contêm grandes quantidades de derivados do ácido salvianólico, sendo o isómero do ácido salvianólico A, o principal derivado. Este isómero foi identificado em extratos de *T. mastichina*, pela primeira vez, e publicado num trabalho recente realizado pelo grupo da candidata (Taghouti, Martins-Gomes, Schäfer, et al. 2020). Os ácidos salvianólicos, em especial o A e o B (os mais abundantes e os mais estudados), estão descritos na literatura por possuírem várias bioatividades, em particular anticancerígenas, regulando as vias da apoptose e do ciclo celular (Chuang et al. 2020, Ma, Tang, and Yi 2019).

Adicionalmente, de entre os vários fitoquímicos analisados, destacam-se os dois triterpenóides, o ácido ursólico e o ácido oleanólico, encontrados nos extratos hidro-etanólicos (devido à sua natureza química não são extraídos com água) de algumas espécies de *Thymus* (Tabela 2). Em particular o ácido ursólico, pelas suas potenciais bioatividades, que inclui efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes, anti-apoptóticos, anti-carcinogénicos (Silva, Alvarado, et al. 2019, Seo et al. 2018) e antimicrobianos (Qian et al. 2020), entre outros.

O perfil fitoquímico do tomilho-laranja mostrou-se muito idêntico ao do *Thymus vulgaris*, destacando-se o elevado conteúdo em ácido rosmarínico, seguido de luteolina e ácido salvianólico K (dados não publicados e (Afonso et al. 2018)), e ainda a ausência dos terpenos, ácido ursólico e ácido oleanólico, nos extratos hidro-etanólicos (dados não publicados).

Tendo em conta a composição em fitoquímicos, é importante avaliar a bioatividade dos extratos, como um todo, mas também avaliar a bioatividade dos componentes maioritários isolados, de forma a avaliar se existe um efeito que relacione

quantidade *versus* amplitude de bioatividade. Sendo também importante conhecer a relação entre a estrutura molecular e os alvos celulares.

3.3.2. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E SUA RELEVÂNCIA A NÍVEL CELULAR

Todos os extratos de *Thymus* indicados na secção anterior demonstraram possuir elevada **atividade antioxidante**, avaliadas pela capacidade de *scavenging*, *in vitro*, de radicais livres tais como o $ABTS^{\bullet+}$ ([2]), hidroxilo ($^{\bullet}OH$) e oxido nítrico ($^{\bullet}NO$) (e.g. (Martins-Gomes et al. 2018, Silva et al. 2020, Taghouti et al. 2018)). O mesmo se verificou para outros *Thymus* descritos na literatura, usando os mesmos ou outros métodos tais como, *scavenging* do radical DPPH ($DPPH^{\bullet}$) ([3]). Elevada capacidade de *scavenging* do $DPPH^{\bullet}$ foi descrita para extratos de *T. zygis*, *T. pulegioides* e tomilho-laranja (Afonso et al. 2018), e de *T. serpyllum* subsp. *serpyllum*, *T. striatus*, e *T. vulgaris* (Kindl, Blažeković, et al. 2015), e outros.

Contudo, destas só as propriedades de *scavenging* do $^{\bullet}OH$ (uma espécie reativa de oxigénio, ROS) e do $^{\bullet}NO$ (uma espécie reativa de nitrogénio, RNS) é que têm interesse biológico, por serem produtos de reações enzimáticas endógenas. As ROS e as RNS são formadas como produtos do metabolismo celular normal da célula e têm uma grande relevância na sinalização celular (Snezhkina et al. 2019). A mitocôndria é o principal local de formação de ROS, sendo o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) produzido em várias reações (e.g. no complexo I, complexo II) e, essencialmente, colocado na matriz mitocondrial, mas também no espaço inter-membranar (produto de complexo II e da glicerol 3-fosfato desidrogenase). O sistema enzimático de defesa antioxidante celular promove a eliminação destas espécies reativas, via superóxido dismutase (SOD), quer na matriz mitocondrial (Mn-SOD) e também no espaço inter-membranar ou citoplasmático (Cu- e Zn-SOD), convertendo $O_2^{\bullet-}$ em peróxido de hidrogénio (H_2O_2; outra ROS). Na matriz mitocondrial, o H_2O_2 é convertido no radical hidroxilo por uma reação de Fenton promovida pela aconitase mitocondrial (Figura 2). Apesar de a mitocôndria estar protegida das ROS pelo sistema enzimático de defesa antioxidante, as ROS originadas na mitocôndria são vastamente implicadas como promotoras de várias

[2] ABTS, Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfónico)
[3] DPPH, 2,2-Difenil-1- picril-hidrazil

doenças (e.g. inflamação, diabetes, envelhecimento precoce, neuro-degeneração, cancro), pelo que o controlo nos níveis de ROS é importante (Snezhkina et al. 2019, Doktorovová et al. 2014).

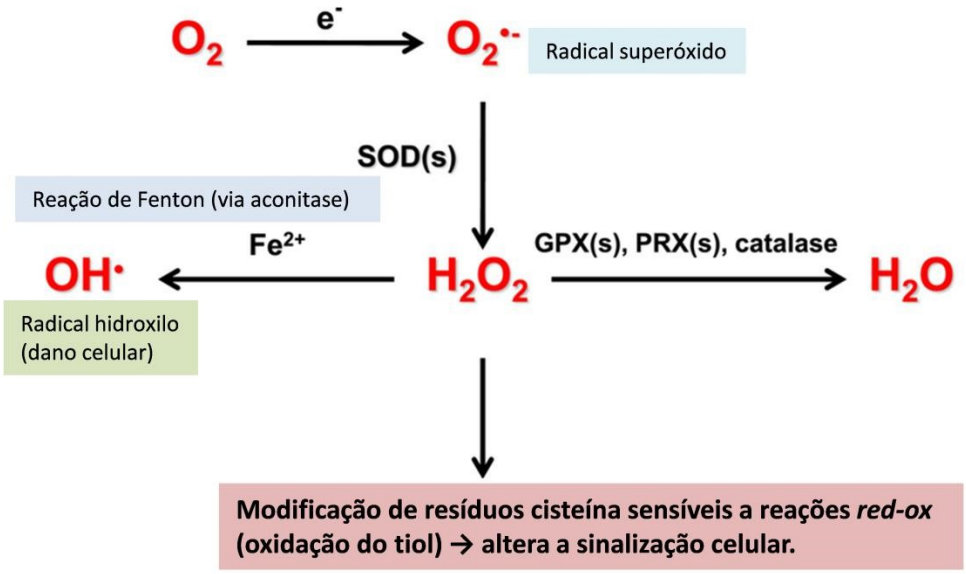

Figura 2. Via simplificada de formação do radical hidroxilo como produto do metabolismo mitocondrial.

De elevada reatividade, o $^{\bullet}OH$ (juntamente com o radical superóxido) é então produto de reações que ocorrem na mitocôndria, como etapas da respiração celular. Todavia, a formação dos radicais $^{\bullet}OH$ e $O_2^{\bullet-}$ também ocorre em outros locais celulares, como produtos da atividade normal por exemplo do peroxissoma (local da β- e α-oxidação de ácidos gordos, do metabolismo de purinas, aminoácidos…), de onde resulta a formação destas ROS mas também de RNS (Fransen et al. 2012). Das RNS formadas, destacam-se o $^{\bullet}NO$ e o peroxinitrito ($ONOO^-$), essencialmente como produtos de reação da xantina oxedorredutase (XOR) sobre vários metabolitos. O $^{\bullet}NO$ é também produto das óxido nítrico sintetase (NOS), produzido a partir de L-arginina (Figura 3), e possui várias propriedades biológicas tais como vasodilatadoras e pro-inflamatórias (Thomas et al. 2008), entre outras. O $^{\bullet}NO$ não é muito reativo mas ao reagir com $O_2^{\bullet-}$ produzindo $ONOO^-$ (Figura 3), produz uma RNS muito citotóxica.

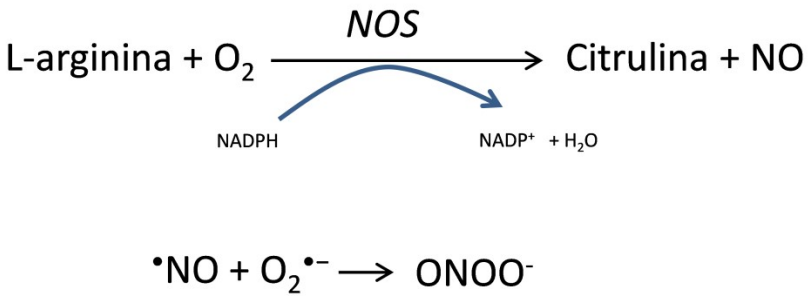

Figura 3. Via de síntese simplificada da formação de óxido nítrico pela óxido nítrico sintetase (NOS, de *nitric oxide synthase*), e reação de óxido nítrico com o radical superóxido produzindo peroxinitrito.

Estas espécies reativas possuem a capacidade de "atacar" várias componentes celulares, sendo por isso causa de peroxidação lipídica, oxidação de proteínas, danos oxidativos no DNA, entre outros (Lipinski 2011, Silva, Silva, Soares, et al. 2019, Snezhkina et al. 2019, Doktorovová et al. 2014). Todos estes danos em estruturas fundamentais para a célula alteram a fisiologia da célula conduzindo-a para vários destinos possíveis, como sejam a morte celular programada ou não-regulada (apoptose vs. necrose) ou na divisão desregulada (originando processos como o cancro).

Os compostos fenólicos (e outros fitoquímicos) presentes nas plantas (e seus derivados) possuem elevada capacidade antioxidante que, a nível fisiológico, podem promover redução de estados inflamatórios e auxiliar as defesas antioxidantes internas (Martins-Gomes, Souto, et al. 2019, Queiroz et al. 2017, Domínguez-Perles et al. 2016).

Devido à capacidade antioxidante, as plantas (e seus produtos ou derivados) exercem papel químio-preventivo quando adicionados à nutrição humana. Contudo, várias moléculas presentes na sua composição fitoquímica, em particular os polifenóis, além da atividade antioxidante também têm sido descritas por possuírem propriedades anti-proliferativas, atuando diretamente nas vias implicadas na divisão celular.

3.3.3. ATIVIDADE ANTI-PROLIFERATIVA / CITOTÓXICA

Muitos estudos têm sido publicados evidenciando os efeitos de componentes bioativas de plantas na proliferação celular, indicando vários mecanismos de ação, como seja modulando a regulação das vias de apoptose, das vias envolvidas na divisão celular, alterando a cito-arquitetura celular ou a homeostasia celular, implicando uma redução no número de células quer pela redução na taxa de divisão celular quer pelo aumento na taxa de morte celular. Dada a diversidade de moléculas presentes no conjunto dos fitoquímicos de uma planta, os alvos celulares são também muito variados.

Atendendo ao facto de que muitas destas plantas são ingeridas diretamente, na forma de condimentos, ou são-no os seus componentes hidrossolúveis, na forma de infusões, o sistema gástrico, em particular o intestino, vai ficar exposto a estes componentes durante o tempo que durar a digestão. E, caso os componentes bioativos sejam absorbidos a nível intestinal, a sua passagem pelo fígado (metabolismo de primeira passagem) expõe este órgão a concentrações mais elevadas do que os subsequentes órgãos. Assim, nesta secção serão apresentados os resultados mais significativos de efeitos anti-proliferativos e/ou citotóxico dos vários extratos, realizados em células Caco-2 (linha celular de adenocarcinoma do cólon humano) e em HepG2 (linha celular de carcinoma hepatocelular humano), por serem, do ponto de vista da candidata, bons modelos celulares para avaliar o efeito de substâncias/componentes de alimentos, dado que a primeira permite extrapolar os efeitos para as células absortivas do epitélio intestinal e a segunda (caso os compostos sejam absorvidos), permite extrapolar para os efeitos hepatotóxicos (ou não) dos componentes, ou mesmo dos produtos do metabolismo destes que ficam no meio de cultura em contacto com as células durante a realização do ensaio (dado que o fígado é o órgão responsável pelo metabolismo de primeira passagem). De seguida, apresenta-se um resumo (em forma de tabela) dos efeitos anti-proliferativos/citotóxicos dos dois extratos (AD e HE) das várias plantas, em células Caco-2 e HepG2, indicando a concentração eficaz para reduzir a viabilidade das células em 50%, em relação ao controlo (IC_{50}), após 24 h de exposição aos extratos.

Tabela 3: Efeito anti-proliferativo descrito em trabalhos anteriores, publicados pela equipa da candidata, relativos a extratos das espécies de *Thymus* estudadas até à data.

		IC_{50} (µg/mL)		
Espécie	Extrato	Caco-2	HepG2	REF
T. carnosus	AD	509,8±19,8	652,6±30,4	(Martins-Gomes et al. 2018)
	HE	**31,7±2,8**	**120,8±3,6**	
T. citriodorus	AD	223,7±8,4	> 500	(Taghouti, Martins-Gomes, et al. 2020a)
	HE	**128,2±5,8**	> 500	
T. mastichina	AD	220,6±3,9	> 500	(Taghouti, Martins-Gomes, Schäfer, et al. 2020)
	HE	**71,2±1,1**	264,6±11,8	
T. pulegioides	AD	**137,7±9,8**	> 500	(Taghouti et al. 2018)
	HE	**148,7±17,4**	> 500	
T. zygis subsp. *zygis*	AD	746,1±6,4	719,2±8,7	(Silva et al. 2020)
	HE	**202,2±5,6**	264,9±10,0	
T. vulgaris	AD	> 500	> 500	(Taghouti, Martins-Gomes, et al. 2020a)
	HE	> 500	495,1±11,6	
Tomilho-laranja	AD	> 500	> 500	(*)
	HE	220,0±40,0	500,0±30,0	

(*) Dados ainda não publicados

Da **Tabela 3** verifica-se que são essencialmente os extratos HE que produzem a maior atividade anti-proliferativa, contudo em alguns casos os extratos AD também exercem elevada atividade (e.g. os de *T. citriodorus*, *T. pulegioides*), que com certeza é reflexo da composição em determinados fitoquímicos. Verifica-se também que o efeito dos extratos é mais pronunciado nas células Caco-2 que nas HepG2 o que, em princípio, reflete as características metabólicas destas células, já que os hepatócitos têm o metabolismo de degradação de xenobióticos bastante mais ativo que os enterócitos.

Quanto ao mecanismo celular responsável por esta atividade anti-proliferativa, verificou-se que extratos de *T. carnosus*, reduziam a proliferação celular de células Caco-2 através da paragem do ciclo celular (*cell-cycle arrest*), sedo o efeito do extrato AD nas fases S e G2/M enquanto o efeito do extrato HE se exerceu na fase G0/G1 (Martins-Gomes, Souto, et al. 2019). Verificou-se ainda, após exposição das células aos extratos, que apesar de o efeito do extrato HE ser mais pronunciado a contribuição da apoptose (medida por citometria de fluxo, usando a marcação com Anexina/PI) era mínima, enquanto para os extratos AD era dose-dependente e pronunciado, com grande

percentagem de células em apoptose tardia (Martins-Gomes, Souto, et al. 2019). Pelo que, se pode dizer que alguns componentes desta planta possuem atividade anti-tumoral.

Além disso, extratos de *T. carnosus* também promoveram alteração da morfologia celular, com comprometimento da adesão intercelular, nomeadamente das caderinas (menor expressão). Este aspeto pode ter como consequência fisiológica a alteração da estrutura da barreira celular, o que seria uma desvantagem, na barreira gastrointestinal. Mas pode ser usado com benefícios na indústria farmacêutica ou cosmética, para utilização como coadjuvantes para aumentar o grau de permeabilidade de fármacos (ou cosméticos) para administração cutânea onde seja necessário atingir camadas mais profundas da pele. Por outro lado, a alteração do padrão de expressão de proteínas de adesão está relacionada com os processos de invasão celular e metastização, que se for suprimida pode atuar como processo anti-tumoral.

Em suma, a atividade anti-proliferativa exibida por fitoquímicos presentes em extratos de plantas pode ser o resultado de vários processos celulares, dada a diversidade de moléculas presentes nos extratos.

3.3.4. ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

As propriedades anti-inflamatórias fazem parte dos atributos etnofarmacológicos de várias espécies de *Thymus* (Stahl-Biskup and Sáez 2003). Vários estudos científicos (realizados por vários autores) têm demonstrado as propriedades anti-inflamatórias de plantas do género *Thymus*, quer *in vitro* quer *in vivo*, sobretudo as promovidas por óleos essenciais (OEs) ou seus componentes. Um dos modelos celulares mais usado para avaliar a atividade anti-inflamatória é a estimulação da linha celular de macrófagos de murganho (células RAW 264.7) com lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano e a posterior quantificação dos produtos desta ativação, por exemplo o óxido nítrico (NO) ou as prostaglandinas (Figura 4).

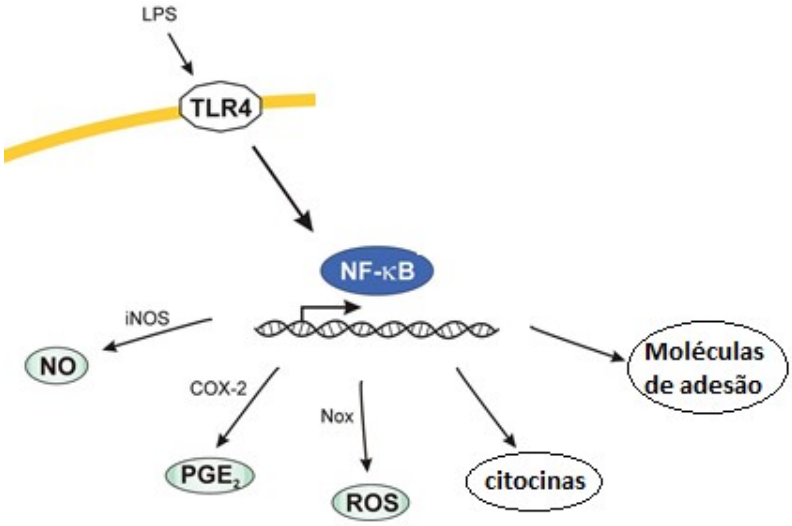

Figura 4. Ação de LPS em macrófagos (células RAW 264.7). O LPS liga-se ao recetor de membrana TLR4 (*Toll-like Receptor 4*) ativando-o, com a subsequente ativação do fator de transcrição NF-kB (*Nuclear Factor kappa B*) que, migrando para o núcleo, promove a expressão dos genes responsáveis pela síntese das enzimas iNOS e ciclooxigenase-2 (COX-2), que levam à formação de NO e prostaglandina E2 (PGE2) e de várias citocinas pro-inflamatórias (e.g. TNF-α (*Tumor Necrosis Factor-alfa*), IL (interleucinas), e outros). Os produtos das iNOS e da COX-2, assim como as citocinas são libertados para o meio podendo ser quantificados.

O óleo essencial de *T. vulgaris*, a concentrações até 100 mg/mL, reduziu a produção de TNF-α e de IL-1β, em células RAW 264.7 estimulada com LPS (Oliveira et al. 2017)). Numa outra linha celular de macrófagos (THP-1), a exposição a OEs de *T. vulgaris*, *T. zygis* e de *Thymus hyemalis* promoveu uma redução significativa da expressão de genes envolvidos na produção de mediadores pro-inflamatório (e.g. TNF-α, IL-1B, e IL-6) e aumentou aqueles envolvidos produção de mediadores anti-inflamatórios (e.g. IL-10) (Ocaña and Reglero 2012). Extratos aquosos de *Thymus atlanticus*, *Thymus satureioides* e de *T. zygis*, demonstraram eficácia anti-inflamatória em modelos *in vivo* de inflamação induzida, em ratos e em murganhos, (Khouya et al. 2015).

Além disso, um estudo de inibição enzimática *in vitro* indicou a inibição da enzima 5-lipo-oxigenase (enzima envolvida na produção dos mediadores inflamatórios, leucotrienos) por óleos essenciais e decocções de *Thymbra capitata*, *T. camphoratus*, *T. carnosus* e *T. mastichina*. Os autores indicaram ainda a possibilidade de outras vias

inflamatórias serem moduladas por componentes fitoquímicas destas plantas.(Albano et al. 2012),

Extratos aquosos e hydro-etanólicos de *T. carnosus* e de *T. zygis* subsp. *zygis* também revelaram capacidade em reduzir a libertação de óxido nítrico (NO) por células RAW 264.7 (linha celular de macrófagos de murinos) estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS), indicativo de **atividade anti-inflamatória**. Em particular, o extrato AD (50 µg/mL) e o HE (10 µg/mL) de *T. carnosus* produziram 67,9% e 68,3%, respetivamente, de inibição da libertação de NO induzida por LPS (Martins-Gomes et al. 2018), enquanto os extratos AD (50 µg/mL) e HE (50 µg/mL) de *T. zygis* subsp. *zygis* produziram 48% e 90% de inibição da libertação de NO induzida por LPS, respetivamente (Silva et al. 2020). A Figura 5 mostra, a título de exemplo, resultados de atividade anti-inflamatória exercidas a concentrações não citotóxicas de extratos de *T. zygis* (Silva et al. 2020).

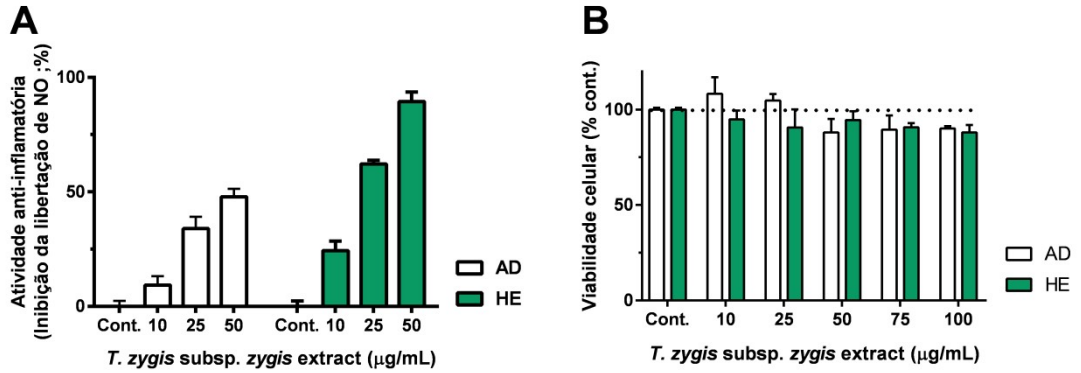

Figura 5. Atividade anti-inflamatória de extratos de *T. zygis subsp. zygis*. (A) Inibição da libertação de óxido nítrico (NO) pelas células RAW 264.7 estimuladas por LPS quando expostas aos extratos aquosos (AD; barras da esquerda, branco) e hidroetanólicos (HE; barras da direita, verde), expressa como percentagem de controlo. (B) Efeito dos extratos AD e HE na viabilidade das células RAW 264.7. Figura adaptada de Silva et al. (2020).

Vários fitoquímicos isolados também têm demonstrado atividade anti-inflamatória, pelo que várias moléculas presentes nos extratos podem modular as vias inflamatória. O ácido rosmarínico (polifenol maioritário na maioria dos *Thymus*) a 10 µM inibiu ~80% do NO libertado por LPS, efeito que foi muito mais pronunciado que o

de quercetina ou de ácido cafeico (outros fenóis presentes nos extratos) (Martins-Gomes et al. 2018).

3.3.5. ATIVIDADE ANTIDIABÉTICA, NEURO-PROTETORA E ANTI-ENVELHECIMENTO

Além de modelos celulares também é comum recorrer a modelos enzimáticos para a avaliação de propriedades bioativas. Várias bioatividades são extrapoladas para *in vivo* pela capacidade de extratos (ou seus componentes) em inibir, *in vitro*, enzimas envolvidas em funções fisiológicas relevantes.

A atribuição de **propriedades antidiabéticas**, pela capacidade de extratos ou moléculas isoladas em inibir as enzimas responsáveis pela digestão dos hidratos de carbono, em particular a alfa-amilase (E.C. 3.2.1.1) e a alfa-glucosidade (E.C. 3.2.1.20), têm sido descritas para várias espécies de *Thymus*, incluindo *T. pulegioides* ((Taghouti et al. 2018), embora a inibição seja fraca), *T. vulgaris* (Alu'datt et al. 2016), e outros. A inibição destas enzimas, presentes no trato gastrointestinal, reduz a concentração de glicose disponível para absorção e consequentemente os níveis glicémicos. Pelo que, do ponto de vista da candidata, a inibição desejada para estas enzimas é uma inibição baixa a moderada, para controlar os níveis glicémicos e não induzir redução da biodisponibilidade de glicose que seja comprometedora para a atividade fisiológica. Outros alvos moleculares, envolvidos na regulação da glicemia, têm sido apontados como alvos de ação de fitoquímicos presentes em *Thymus* e outras PAMs, tais como a dipeptidil peptidase-4 (DPP-4; E.C. 3.4.14.5), o receptor de peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1, *glucagon-like peptide* 1), o transportador sódio-glucose tipo 2 (SGLT2, *sodium glucose transporter* 2), e outos (e.g. (Vieira et al. 2019, Pereira et al. 2019)).

Também alguns estudos usando modelos *in vivo*, em particular o modelo de diabetes induzido em rato por administração de estreptozotocina (agente tóxico para a célula beta-pancreática), têm demonstrado as propriedades antidiabéticas dos componentes bioativos das plantas do género *Thymus*. A título de exemplo, extratos de *Thymus praecox* subsp. *skorpilii* var. *skorpilii* administrado por via oral (100 mg/kg

b.w) a ratos diabéticos mostraram melhorar vários marcadores moleculares envolvidos na normalização da glicemia (Cam et al. 2019).

As **propriedades neuro-protetoras** de extratos e óleos essenciais de vários *Thymus* têm sido reportadas pela inibição *in vitro* da enzima acetilcolinesterase (AChE; E.C. 3.1.1.7), pelo facto de algumas doenças neuro-degenerativas serem a consequência de um declínio na produção de acetilcolina (ACh), como é o caso da doença de Alzheimer, da doença de Parkinson e da demência senil, nas quais os níveis reduzidos de ACh no cérebro são a principal alteração bioquímica comum (Aktumsek et al. 2013, Soreq and Seidman 2001). Várias espécies de plantas aromáticas da flora portuguesa incluindo *Thymus* demonstraram eficácia na inibição da AChE (Albano et al. 2012, Kindl, Blazekovic, et al. 2015). De salientar que, os extratos de *T. pulegioides* além da elevada capacidade para inibir a AChE, também exibiram atividade inibitória da tirosinase (Taghouti et al. 2018), enzima responsável pela formação de melanina (na pele e cabelo) e de neuromelanina, produzida por certos neurónios, e implicada em processos de neuro-degeneração pelo facto de interagir com muitos tóxicos (por exemplo, metais, pesticidas), podendo ter papel significativo tanto no início quanto na progressão da neuro-degeneração (Karlsson and Lindquist 2016). A inibição da AChE também foi demonstrada usando Eriodictiol, Kampferol, Quercetina (dados de investigação da candidata, ainda não publicados), ácido rosmarínico (Kindl, Blazekovic, et al. 2015), e outros. A inibição da tirosinase (EC 1.14.18.1) pode ainda ser aproveitada para o desenvolvimento de cosméticos com propriedades despigmentantes, produtos cosmecêuticos com **propriedades anti-envelhecimento**, e na indústria alimentar, como agentes anti-escurecimento (*antibrowning*) (Zolghadri et al. 2019). No que diz respeito às propriedades anti-envelhecimento promovidas por extratos e fitoquímicos, outras enzimas, tais como a elastase (E.C. 3.4.21.36) a colagenase (E.C. 3.4.24.3), têm sido alvo de estudo com vista à produção de cosmecêuticos anti-rugas (e.g. (Thring, Hili, and Naughton 2009, Taghouti et al. 2018)).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta Lição terminará com a chamada de atenção para a variedade de moléculas presentes nos extratos de cada planta. Será também relembrado que a composição em moléculas bioativas, quer em variedade quer em quantidade, é o reflexo do metabolismo secundário da planta e que depende de condições edafo-climáticas, como sejam a composição e pH do solo e também as variações térmicas durante o crescimento da planta. Será ainda lembrado que, esta diversidade de moléculas irá refletir-se num vasto número de alvos moleculares, e consequentemente numa vasta ação biológica, i.e., várias bioatividades.

Será também salientado que, de todas estas bioatividades reportadas na literatura, a maioria é testada *in vitro* e extrapolada, **ressaltando um problema que é o da biodisponibilidade e biotransformação**. Se é verdade que alguns destes alvos estão acessíveis aos fitoquímicos, como sejam as alfa-amilase e alfa-glucosidade (a primeira excretada para a saliva e para o suco pancreático, e a segunda localizada nas microvilosidades dos enterócitos, na face externa), o mesmo não se pode dizer da AChE (presente na placa neuro-motora e na fenda sináptica de neurónios colinérgicos), e de outras, onde um efeito fisiológico requeria uma absorção intestinal (i.e. vencer a barreira intestinal), uma primeira passagem (no fígado) sem metabolização, transformação e/ou destruição dos fitoquímicos e, transporte até aos tecidos alvo, tendo ainda de vencer algumas barreiras (e.g. barreira hematoencefálica). Para aumentar a biodisponibilidade, várias estratégia, nomeadamente recorrendo a sistemas nanoparticulados, têm sido propostos (e.g. (Silva, Martins-Gomes, et al. 2019, Fangueiro, Souto, and Silva 2016)). Contudo, ainda há um logo caminho de investigação para explorar, correlacionar e validar os efeitos bioativos dos fitoquímicos presentes em plantas comestíveis, em particular as PAMs, onde se incluem os *Thymus*.

5. BIBLIOGRAFIA

Afonso, Andrea F., Olívia R. Pereira, Mónica Válega, Artur M. S. Silva, and Susana M. Cardoso. 2018. "Metabolites and Biological Activities of *Thymus zygis*, *Thymus pulegioides*, and *Thymus fragrantissimus* Grown under Organic Cultivation." *Molecules* no. 23 (7). doi: 10.3390/molecules23071514.

Aktumsek, A., G. Zengin, G. O. Guler, Y. S. Cakmak, and A. Duran. 2013. "Antioxidant potentials and anticholinesterase activities of methanolic and aqueous extracts of three endemic *Centaurea* L. species." *Food Chem Toxicol* no. 55:290-6. doi: 10.1016/j.fct.2013.01.018.

Albano, S. M., A. Sofia Lima, M. Graça Miguel, L. G. Pedro, J. G. Barroso, and A. C. Figueiredo. 2012. "Antioxidant, anti-5-lipoxygenase and antiacetylcholinesterase activities of essential oils and decoction waters of some aromatic plants." *Records of Natural Products* no. 6 (1):35-48.

Allen, D., M. Bilz, D.J. Leaman, R.M. Miller, A. Timoshyna, and J. Window. 2014. *European Red List of Medicinal Plants*: Luxembourg: Publications Office of the European Union.

Alu'datt, Muhammad H., Taha Rababah, Ayman Johargy, Sana Gammoh, Khalil Ereifej, Mohammad N. Alhamad, Mary Susan Brewer, Abdullah A. Saati, Stan Kubow, and Mervat Rawshdeh. 2016. "Extraction, optimisation and characterisation of phenolics from *Thymus vulgaris* L.: phenolic content and profiles in relation to antioxidant, antidiabetic and antihypertensive properties." *Int J Food Sci Tech* no. 51 (3):720-730. doi: 10.1111/ijfs.12944.

Atanasov, Atanas G., Birgit Waltenberger, Eva-Maria Pferschy-Wenzig, Thomas Linder, Christoph Wawrosch, Pavel Uhrin, Veronika Temml, Limei Wang, Stefan Schwaiger, Elke H. Heiss, Judith M. Rollinger, Daniela Schuster, Johannes M. Breuss, Valery Bochkov, Marko D. Mihovilovic, Brigitte Kopp, Rudolf Bauer, Verena M. Dirsch, and Hermann Stuppner. 2015. "Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review." *Biotechnology Advances* no. 33 (8):1582-1614. doi: https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.08.001.

Balao, F., F.B. Caldas, F. Casimiro-Soriguer Solanas, E. Sánchez-Gullón, and S. Talavera Lozano. 28 May 2020. *Thymus carnosus. The IUCN Red List of Threatened Species 2011: e.T162164A5551116.* 201128 May 2020]. Available from https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2011-1.RLTS.T162164A5551116.

Barrero, Alejandro F., M. Mar Herrador del Pino, Adriana González Portero, Pilar Arteaga Burón, Jesús F. Arteaga, Jesús Burillo Alquézar, Carmen Elisa Díaz, and Azucena González Coloma. 2013. "Terpenes and polyacetylenes from cultivated *Artemisia granatensis* boiss (Royal chamomile) and their defensive properties." *Phytochemistry* no. 94:192-197. doi: https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.04.002.

Bilz, M. 2020. *Thymus camphoratus. The IUCN Red List of Threatened Species 2011: e.T161874A5507698.* 2011 [cited Junho, 2020 2020].

Cam, Muhammet Emin, Ayse Nur Hazar-Yavuz, Sila Yildiz, Busra Ertas, Betul Ayaz Adakul, Turgut Taskin, Saadet Alan, and Levent Kabasakal. 2019. "The methanolic extract of *Thymus praecox* subsp. *skorpilii* var. skorpilii restores glucose homeostasis, ameliorates insulin resistance and improves pancreatic β-cell function on streptozotocin/nicotinamide-induced type 2 diabetic rats." *Journal of Ethnopharmacology* no. 231:29-38. doi: https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.10.028.

Camejo-Rodrigues, Joana, Lia Ascensão, M. Àngels Bonet, and Joan Vallès. 2003. "An ethnobotanical study of medicinal and aromatic plants in the Natural Park of "Serra de São Mamede" (Portugal)." *Journal of Ethnopharmacology* no. 89 (2):199-209. doi: https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00270-8.

Carapeto, A., P.G. García Murillo, A. Buira, and T. Monteiro-Henriques. *Thymus capitellatus. The IUCN Red List of Threatened Species 2017: e.T161887A103526257.* 2017 [cited 20.05.2020. Available from https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-3.RLTS.T161887A103526257.

Carbone, C., C. Martins-Gomes, C. Caddeo, A. M. Silva, T. Musumeci, R. Pignatello, G. Puglisi, and E. B. Souto. 2018. "Mediterranean essential oils as precious matrix components and active ingredients of lipid nanoparticles." *International Journal of Pharmaceutics* no. 548 (1):217-226. doi: https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.06.064.

Chuang, Chun-Yi, Yung-Chuan Ho, Chiao-Wen Lin, Wei-En Yang, Yung-Luen Yu, Ming-Chieh Tsai, Shun-Fa Yang, and Shih-Chi Su. 2020. "Salvianolic acid A suppresses MMP-2 expression and restrains cancer cell invasion through ERK signaling in human nasopharyngeal carcinoma." *Journal of Ethnopharmacology* no. 252:112601. doi: https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112601.

Doktorovová, S., D. L. Santos, I. Costa, T. Andreani, E. B. Souto, and A. M. Silva. 2014. "Cationic solid lipid nanoparticles interfere with the activity of antioxidant enzymes in hepatocellular carcinoma cells." *Int J Pharm* no. 471 (1-2):18-27. doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.05.011.

Domínguez-Perles, R., A. Guedes, M. Queiroz, A. M. Silva, and Airna Barros. 2016. "Oxidative stress prevention and anti-apoptosis activity of grape (*Vitis vinifera* L.) stems in human keratinocytes." *Food Res Int* no. 87:92-102. doi: 10.1016/j.foodres.2016.06.030.

Euro+Med. 2020. *Euro+Med PlantBase - the information resource for Euro-Mediterranean plant diversity.* 2006-2018 [cited 20 Junho 2020 2020]. Available from http://ww2.bgbm.org/EuroPlusMed/.

Fangueiro, Joana F., Eliana B. Souto, and Amélia M. Silva. 2016. "9 - Encapsulation of nutraceuticals in novel delivery systems." In *Nutraceuticals*, edited by Alexandru Mihai Grumezescu, 305-342. Academic Press.

Fransen, Marc, Marcus Nordgren, Bo Wang, and Oksana Apanasets. 2012. "Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: Implications for human disease." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* no. 1822 (9):1363-1373. doi: https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.12.001.

Greeson, J. M., B. Sanford, and D. A. Monti. 2001. "St. John's wort (*Hypericum perforatum*): a review of the current pharmacological, toxicological, and clinical literature." *Psychopharmacology (Berl)* no. 153 (4):402-14. doi: 10.1007/s002130000625.

Joshi, Rajesh K. 2014. "Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Ocimum basilicum* L. (sweet basil) from Western Ghats of North

West Karnataka, India." *Ancient science of life* no. 33 (3):151-156. doi: 10.4103/0257-7941.144618.

Karlsson, O., and N. G. Lindquist. 2016. "Melanin and neuromelanin binding of drugs and chemicals: toxicological implications." *Arch Toxicol* no. 90 (8):1883-91. doi: 10.1007/s00204-016-1757-0.

Khouya, Tarik, Mhamed Ramchoun, Abdelbassat Hmidani, Souliman Amrani, Hicham Harnafi, Mohamed Benlyas, Younes Filali Zegzouti, and Chakib Alem. 2015. "Anti-inflammatory, anticoagulant and antioxidant effects of aqueous extracts from Moroccan thyme varieties." *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* no. 5 (8):636-644. doi: https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.05.011.

Kindl, M., B. Blazekovic, F. Bucar, and S. Vladimir-Knezevic. 2015. "Antioxidant and anticholinesterase potential of six *Thymus* species." *Evid Based Complement Alternat Med* no. 2015:403950. doi: 10.1155/2015/403950.

Kindl, Marija, Biljana Blažeković, Franz Bucar, and Sanda Vladimir-Knežević. 2015. "Antioxidant and Anticholinesterase Potential of Six *Thymus* Species." *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* no. 2015:403950. doi: 10.1155/2015/403950.

Leal, F., M. Taghouti, F. M. Nunes, A. M. Silva, A. C. Coelho, and M. Matos. 2017. "*Thymus* Plants: A Review—Micropropagation, Molecular and Antifungal Activity." In *Active Ingredients from Aromatic and Medicinal Plants*, edited by Hany A. El-Shemy. InTech.

Lipinski, Boguslaw. 2011. "Hydroxyl Radical and Its Scavengers in Health and Disease." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* no. 2011:809696. doi: 10.1155/2011/809696.

Ma, Lunkun, Liling Tang, and Qian Yi. 2019. "Salvianolic Acids: Potential Source of Natural Drugs for the Treatment of Fibrosis Disease and Cancer." *Frontiers in pharmacology* no. 10:97-97. doi: 10.3389/fphar.2019.00097.

Martins-Gomes, Carlos , Fernando M. Nunes, Ana Sampaio, Eliana B. Souto, and Amélia M. Silva. 2019. "Rosmarinic Acid: Sources, Bioactivities and Health Benefits." In *Phytochemicals: Plant Sources and Potential Health Benefits*, edited by Iman Ryan, 109-146. New York: Nova Science Publishers, Inc.

Martins-Gomes, Carlos, Eliana B. Souto, Fernanda Cosme, Fernando M. Nunes, and Amélia M. Silva. 2019. "*Thymus carnosus* extracts induce anti-proliferative activity in Caco-2 cells through mechanisms that involve cell cycle arrest and apoptosis." *Journal of Functional Foods* no. 54:128-135. doi: https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.01.010.

Martins-Gomes, Carlos, Meriem Taghouti, Judith Schäfer, Mirko Bunzel, Amélia M. Silva, and Fernando M. Nunes. 2018. "Chemical characterization and bioactive properties of decoctions and hydroethanolic extracts of *Thymus carnosus* Boiss." *Journal of Functional Foods* no. 43:154-164. doi: https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.02.012.

McKay, D. L., and J. B. Blumberg. 2006. "A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.)." *Phytother Res* no. 20 (8):619-33. doi: 10.1002/ptr.1936.

Neves, José Manuel, Carla Matos, Carla Moutinho, Glória Queiroz, and Lígia Rebelo Gomes. 2009. "Ethnopharmacological notes about ancient uses of medicinal plants in Trás-os-Montes (northern of Portugal)." *Journal of Ethnopharmacology* no. 124 (2):270-283. doi: https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.04.041.

Ocaña, A., and G. Reglero. 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* no. 2012:104706-104706. doi: 10.1155/2012/104706.

Oliveira, J. R., D. de Jesus Viegas, A. P. R. Martins, C. A. T. Carvalho, C. P. Soares, S. E. A. Camargo, A. O. C. Jorge, and L. D. de Oliveira. 2017. "*Thymus vulgaris* L. extract has antimicrobial and anti-inflammatory effects in the absence of cytotoxicity and genotoxicity." *Arch Oral Biol* no. 82:271-279. doi: 10.1016/j.archoralbio.2017.06.031.

Pereira, Andreia S. P., Antonio J. Banegas-Luna, Jorge Peña-García, Horacio Pérez-Sánchez, and Zeno Apostolides. 2019. "Evaluation of the Anti-Diabetic Activity of Some Common Herbs and Spices: Providing New Insights with Inverse Virtual Screening." *Molecules (Basel, Switzerland)* no. 24 (22):4030. doi: 10.3390/molecules24224030.

Qian, Weidong, Wenjing Wang, Jianing Zhang, Ting Wang, Miao Liu, Min Yang, Zhaohuan Sun, Xiang Li, and Yongdong Li. 2020. "Antimicrobial and antibiofilm activities of ursolic acid against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*." *The Journal of Antibiotics* no. 73 (6):382-391. doi: 10.1038/s41429-020-0285-6.

Queiroz, M., D. Oppolzer, I. Gouvinhas, A. M. Silva, Airna Barros, and R. Domínguez-Perles. 2017. "New grape stems' isolated phenolic compounds modulate reactive oxygen species, glutathione, and lipid peroxidation in vitro: Combined formulations with vitamins C and E." *Fitoterapia* no. 120:146-157. doi: 10.1016/j.fitote.2017.06.010.

Renata, Prusinowska, and B. Śmigielski Krzysztof. 2014. "Composition, biological properties and therapeutic effects of lavender (*Lavandula angustifolia* L). A review." *Herba Polonica* no. 60 (2):56-66. doi: https://doi.org/10.2478/hepo-2014-0010.

Sampaio, Ana, Alfredo Aires, B. Eliana Souto, and A. M Silva. 2017. "Essential Oils, Polyphenols and Glycosides: Secondary Plant Metabolites against Human Pathogenic Microbes." In *Frontiers in Clinical Drug Research: Anti-Infectives*, edited by Atta-ur-Rahman, 139-186. Bentham Science Publishers.

Sen, T., and S. K. Samanta. 2015. "Medicinal plants, human health and biodiversity: a broad review." *Adv Biochem Eng Biotechnol* no. 147:59-110. doi: 10.1007/10_2014_273.

Seo, Dae Yun, Sung Ryul Lee, Jun-Won Heo, Mi-Hyun No, Byoung Doo Rhee, Kyung Soo Ko, Hyo-Bum Kwak, and Jin Han. 2018. "Ursolic acid in health and disease." *The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology* no. 22 (3):235-248. doi: 10.4196/kjpp.2018.22.3.235.

Silva, A. M., C. Martins-Gomes, J. F. Fangueiro, T. Andreani, and E. B. Souto. 2019. "Comparison of antiproliferative effect of epigallocatechin gallate when loaded into cationic solid lipid nanoparticles against different cell lines." no. 24 (10):1243-1249. doi: 10.1080/10837450.2019.1658774.

Silva, A. M., C. Martins-Gomes, E. B. Souto, J. Schäfer, J. A. Santos, M. Bunzel, and F. M. Nunes. 2020. "*Thymus zygis* subsp. *zygis* an endemic Portuguese plant: phytochemical profiling, antioxidant, anti-proliferative and anti-inflammatory activities." *Antioxidants* no. 9 (6):482. doi: https://doi.org/10.3390/antiox9060482.

Silva, Amélia M. , Helen L. Alvarado, Guadalupe Abrego, Carlos Martins-Gomes, Maria L. Garduño-Ramirez, María L. García, Ana C. Calpena, and Eliana B. Souto. 2019. "In Vitro Cytotoxicity of Oleanolic/Ursolic Acids-Loaded in PLGA Nanoparticles in Different Cell Lines." *Pharmaceutics* no. 11 (8). doi: 10.3390/pharmaceutics11080362.

Silva, Amélia M., Sandra C. Silva, Jorge P. Soares, Carlos Martins-Gomes, João Paulo Teixeira, Fernanda Leal, and Isabel Gaivão. 2019. "*Ginkgo biloba* L. Leaf Extract Protects HepG2 Cells Against Paraquat-Induced Oxidative DNA Damage." *Plants (Basel, Switzerland)* no. 8 (12):556. doi: 10.3390/plants8120556.

Silva, Pedro T. M., Marta A. F. Silva, Luís Silva, and Ana M. L. Seca. 2019. Ethnobotanical Knowledge in Sete Cidades, Azores Archipelago: First Ethnomedicinal Report. *Plants (Basel, Switzerland)* 8 (8), https://doi.org/10.3390/plants8080256.

Snezhkina, Anastasiya V., Anna V. Kudryavtseva, Olga L. Kardymon, Maria V. Savvateeva, Nataliya V. Melnikova, George S. Krasnov, and Alexey A. Dmitriev. 2019. "ROS Generation and Antioxidant Defense Systems in Normal and Malignant Cells." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* no. 2019:6175804. doi: 10.1155/2019/6175804.

Soreq, H., and S. Seidman. 2001. "Acetylcholinesterase - new roles for an old actor." *Nat Rev Neurosci* no. 2 (4):294-302. doi: 10.1038/35067589.

Stahl-Biskup, E. , and F. Sáez. 2003. *Thyme, The genus Thymus*. 1st ed. London: CRC Press - Taylor and Francis.

Taghouti, M., C. Martins-Gomes, L. M. Félix, J. Schäfer, J. A. Santos, M. Bunzel, F. M. Nunes, and A. M. Silva. 2020a. "Polyphenol composition and biological activity of *Thymus citriodorus* and *Thymus vulgaris*: comparison with endemic Iberian *Thymus* species." *Food Chemistry*:(under review).

Taghouti, M., C. Martins-Gomes, J. Schafer, L. M. Felix, J. A. Santos, M. Bunzel, F. M. Nunes, and A. M. Silva. 2018. "*Thymus pulegioides* L. as a rich source of antioxidant, anti-proliferative and neuroprotective phenolic compounds." *Food & Function* no. 9 (7):3617-3629. doi: 10.1039/c8fo00456k.

Taghouti, M., C. Martins-Gomes, J. Schäfer, J. A. Santos, M. Bunzel, F. M. Nunes, and A. M Silva. 2020. "Chemical Characterization and Bioactivity of Extracts from *Thymus mastichina*: A *Thymus* with a Distinct Salvianolic Acid Composition." *Antioxidants* no. 9 (1):34.

Taghouti, Meriem, Carlos Martins-Gomes, Luís M. Félix, Judith Schäfer, João A. Santos, Mirko Bunzel, Fernando M. Nunes, and Amélia M. Silva. 2020b. "Polyphenol composition and biological activity of *Thymus citriodorus* and *Thymus vulgaris*: comparison with endemic Iberian *Thymus* species." *Food Chemistry*:127362. doi: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127362.

Thomas, Douglas D., Lisa A. Ridnour, Jeffrey S. Isenberg, Wilmarie Flores-Santana, Christopher H. Switzer, Sonia Donzelli, Perwez Hussain, Cecilia Vecoli, Nazareno Paolocci, Stefan Ambs, Carol A. Colton, Curtis C. Harris, David D. Roberts, and David A. Wink. 2008. "The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling." *Free radical biology & medicine* no. 45 (1):18-31. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.03.020.

Thring, T. S., P. Hili, and D. P. Naughton. 2009. "Anti-collagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities of extracts from 21 plants." *BMC Complement Altern Med* no. 9:27. doi: 10.1186/1472-6882-9-27.

Vieira, Raquel, B. Selma Souto, Elena Sánchez-López, Ana López Machado, Patricia Severino, Sajan Jose, Antonello Santini, Ana Fortuna, L. Maria García, M. Amelia Silva, and B. Eliana Souto. 2019. "Sugar-Lowering Drugs for Type 2 Diabetes Mellitus and Metabolic Syndrome—Review of Classical and New Compounds: Part-I." *Pharmaceuticals* no. 12 (4). doi: 10.3390/ph12040152.

Zaccardelli, Massimo, Catello Pane, Michele Caputo, Alessandra Durazzo, Massimo Lucarini, Amélia M. Silva, Patrícia Severino, Eliana B. Souto, Antonello Santini, and Vincenzo De Feo. 2020. "Sage Species Case Study on a Spontaneous Mediterranean Plant to Control Phytopathogenic Fungi and Bacteria." *Forests* no. 11 (6). doi: 10.3390/f11060704.

Zolghadri, Samaneh, Asieh Bahrami, Mahmud Tareq Hassan Khan, J. Munoz-Munoz, F. Garcia-Molina, F. Garcia-Canovas, and Ali Akbar Saboury. 2019. "A comprehensive review on tyrosinase inhibitors." *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry* no. 34 (1):279-309. doi: 10.1080/14756366.2018.1545767.

Vila Real, Fevereiro de 2021

_____

Amélia M. Lopes Dias da Silva