Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Composição e bioatividade de óleos essenciais de *Thymus vulgaris, Thymus citriodorus* e *Thymus fragrantissimus.*

Dissertação de Mestrado em Biotecnologia para as Ciências da Saúde

Paulo Jorge Oliveira Sampaio

Orientadora: Professora Doutora Fernanda Maria Madaleno Rei Tomás Leal Santos

Coorientador: Professora Doutora Amélia M. Lopes Dias da Silva

Vila Real, Abril de 2019

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Composição e bioatividade de óleos essenciais de *Thymus vulgaris, Thymus citriodorus* e *Thymus fragrantissimus.*

Dissertação de Mestrado em Biotecnologia para as Ciências da Saúde

Paulo Jorge Oliveira Sampaio

Orientadora: Professora Doutora Fernanda Maria Madaleno Rei Tomás Leal Santos

Coorientador: Professora Doutora Amélia M. Lopes Dias da Silva

Composição do Júri:

_____

_____

_____

_____

Data: _____

Classificação: _____

Vila Real, Abril de 2019

Este trabalho foi realizado para obter o grau de mestre
em Biotecnologia para as Ciências da Saúde.
Todas as contribuições não originais foram devidamente identificadas com indicação
da fonte.

Agradecimentos

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

Para começar gostaria de agradecer à Professora Doutora Fernanda Leal por se ter disponibilizado a ser minha orientadora da dissertação, pela sugestão do tema, pela ajuda prestada, pela sua paciência e pelos seus ensinamentos.

À Professora Doutora Amélia da Silva um grande obrigado por ter aceitado ser a minha coorientadora, agradeço a disponibilidade, paciência, ajuda e pelos seus ensinamentos.

Ao Professor Doutor Fernando Nunes pela disponibilidade ajuda e pelos seus ensinamentos.

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

À ERVITAL (Plantas Aromáticas e Medicinais, Lda; Mezio Castro Daire, Portugal), pelo fornecimento das plantas usadas neste trabalho.

À minha família principalmente aos meus pais por todo amor, carinho, amizade e paciência que tiveram comigo nesta fase da minha vida.

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

Resumo

Tem havido uma crescente popularidade no uso de plantas medicinais e aromáticas, como é o caso de várias espécies do género *Thymus* L., nome comum tomilho, às quais têm sido atribuídas várias propriedades medicinais, tais como: antifúngica, antibacteriana, antioxidante, anti-inflamatória, entre outras.

Neste trabalho foram utilizadas as espécies *Thymus vulgaris*, *Thymus* × *citriodorus* e *Thymus fragrantissimus*. O trabalho dividiu-se em 3 fases principais, uma primeira de cultura *in vitro* de plantas, com o objetivo de colocar exemplares *in vitro* e perceber quais as dificuldades de cultura destas espécies. Seguida de extração de óleos essenciais das plantas mencionadas e avaliação da sua composição química. E por fim uma avaliação da bioatividade dos óleos essenciais, tanto da sua citotoxicidade como da sua atividade anti-inflamatória (a concentrações não citotóxicas).

Relativamente à primeira fase, a grande quantidade de contaminação e agressividade da descontaminação, tornam o estabelecimento das espécies *in vitro* num estudo muito difícil. A desinfeção que originou melhores resultados foi a de 2 partes de lixívia para 3 partes de água, durante 45 minutos, apenas no caso do *Thymus x citriodorus* e do *Thymus vulgaris*.

Na segunda fase, os rendimentos da extração dos óleos essenciais obtidos foram, 0,0216% para o *Thymus x citriodorus,* 0,0989% para o *Thymus fragrantissimus* e 0,057% para o *Thymus vulgaris.* Os compostos maioritários encontrados foram, o Geraniol (72,85%) no *Thymus x citriodorus*, o Borneol (69,30%) no *Thymus fragrantissimus* e o Geraniol (41,20%), o Timol (15,68%) e o *p*-Cimeno (10,01%) no *Thymus vulgaris*.

Na última fase deste trabalho, foi usada a linha celular Raw 264.7 para a avaliação da citotoxicidade e da atividade anti-inflamatória dos óleos essenciais. Na avaliação da citotoxicidade foram realizados 2 ensaios com as concentrações de 1, 25, 50, 100 e 200 μg/mL e de 10, 20, 30, 40 e 50 μg/mL com tempo de exposição de 24 e 48 h, observando-se que o de *Thymus vulgaris* é o que apresenta maior citotoxicidade. Na atividade anti-inflamatória foram usadas concentrações de 1, 5 e 10 μg/mL, observando-se que o de *Thymus x citriodorus* era o que apresentava maior atividade anti-inflamatória e que o de *Thymus vulgaris* apresentava atividade pró-inflamatória.

Palavras-chave: *Thymus*; Bioatividades; Anti-inflamatória; Óleos essenciais; Composição química (GC-MS); Cultura *in vitro*.

Abstract

There has been a growing popularity in the use of medicinal and aromatic plants, as is the case of specied from the genus *Thymus*, common name thyme, which have been shown to present various medicinal properties, such as: antifungal, antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory, among others .

In this work the species *Thymus vulgaris*, *Thymus × citriodorus* and *Thymus fragrantissimus* were used. The work was divided into 3 main phases, the first one the *in vitro* culture of plants, with the objective of placing *in vitro* specimens and to realize the difficulties of culturing these species. The second phase was the extraction of essential oils, from the plants mentioned, and evaluation of their chemical composition. And, finally an evaluation of the bioactivity of the essential oils, both concerning its cytotoxicity and its anti-inflammatory activity (at non-cytotoxic concentrations).

In relation to the first phase, the great amount of contamination and aggressiveness of the decontamination, make *in vitro* establishment of the species under study very difficult. The best-performing disinfection was 2 parts bleach to 3 parts water, for 45 minutes, only for *Thymus x citriodorus* and *Thymus vulgaris*.

In the second phase, extraction yields of the essential oils obtained were 0.0216% for *Thymus x citriodorus*, 0.0989% for *Thymus fragrantissimus* and 0.057% for *Thymus vulgaris*. The major compounds were Geraniol (72.85%) in *Thymus x citriodorus*, Borneol (69.30%) in *Thymus fragrantissimus* and Geraniol (41.20%), Thymol (15.68%) and *p*-Cymene (10.01%) in *Thymus vulgaris*.

In the last phase of this work, Raw 264.7 cells were used for the evaluation of essential oils induced cytotoxicity and anti-inflammatory activity. Concerning to cytotoxicity, 2 assays were performed with concentrations of 1, 25, 50, 100 and 200 μg / mL and of 10, 20, 30, 40 and 50 μg / mL with exposure time of 24 and 48 h, *Thymus vulgaris* essential oils is the one producing the highest cytotoxicity. Anti-inflammatory activity was teste with concentrations of 1, 5 and 10 μg / mL, with *Thymus x citriodorus* being the one with the highest anti-inflammatory activity and *Thymus vulgaris* showing pro-inflammatory activity.

Keywords: *Thymus*; Bioactivity; Anti-inflammatory; Essencial oils; Chemical composition (GC-MS); Culture *in vitro*.

Índice

Agradecimentos ..... **vii**
Resumo ..... **ix**
Abstract ..... **xi**
Índice ..... **xiii**
Índice de figuras ..... **xvii**
Índice de tabelas ..... **xix**
Índice de equações ..... **xxi**
1. Introdução **1**
1.1. Plantas aromáticas e medicinais 1
1.2. Género *Thymus* 2
1.2.1. *Thymus x citriodorus* 3
1.2.2. *Thymus fragrantissimus* 5
1.2.3. *Thymus vulgaris* 6
1.3. Óleos essenciais 9
1.3.1. Composição e biossíntese 10
1.3.1.1. Terpenos 10
1.3.1.2. Compostos fenólicos 12
1.3.1.3. Alcaloides 12
1.3.2. Importância económica 12
1.3.3. Bioatividade 13
1.3.4. Extração dos óleos essenciais 14
1.3.4.1. Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrómetro de Massas 14
1.4. Cultura *in vitro* de células animais 15

1.4.1. RAW264.7 16

1.4.2. Avaliação da citotoxicidade 17

1.4.3. Atividade anti-inflamatória 18

1.5. Cultura *in vitro* de células vegetais 19

2. Objetivos **23**

3. Material e métodos **25**

3.1. Origem do material vegetal 25

3.2.Cultura de células vegetais 25

3.2.1. Manutenção e manuseamento 25

3.2.2. Meios de cultura 25

3.2.3. Desinfeção e estabelecimento dos explantes em cultura 26

3.3. Extração dos óleos essenciais 27

3.4. Análise da composição do óleo essencial 30

3.4.1. Cromatografia em fase gasosa acoplada à espetrometria de massa 30

3.5. Cultura de células animais 31

3.5.1. Manutenção e manuseamento 31

3.5.2. Meios de Cultura e soluções 31

3.5.2.1. Meio de cultura sem soro 32

3.5.2.2. Soluções *stock* 32

3.5.3. Manutenção da linha celular 32

3.5.4. Subcultura das células 32

3.5.5. Contagem de células 33

3.6. Avaliação da citotoxicidade 33

3.7. Atividade anti-inflamatória 34

3.8. Análise dos dados 35

4. Resultados e discussão **37**

4.1. Desinfeção e estabelecimento dos explantes *in vitro* 37

4.2. Rendimento da extração dos óleos essenciais 39

4.3. Composição dos óleos essenciais 39

4.4. Avaliação da citotoxicidade 42

4.5. Atividade anti-inflamatória 44

5. Conclusões Gerais **47**

6. Bibliografia **49**

Índice de figuras

Figura 1: *Thymus x citriodorus* 3

Figura 2: *Thymus fragrantissimus*..... 5

Figura 3: *Thymus vulgaris*..... 6

Figura 4: Biossíntese dos terpenos. 11

Figura 5: Alguns exemplos de terpenos. 11

Figura 6: Reações químicas envolvidas na medição do NO_2^- usando os Reagentes Griess. 19

Figura 7: Principais métodos de micropropagação. 21

Figura 8: Destilação por arraste a vapor. 28

Figura 9: Separação do óleo da fase aquosa..... 29

Figura 10: Cromatografia gasosa acoplada à espetrometria de massa (GC-MS)..... 30

Figura 11: Leitura absorbância..... 35

Figura 12: Cromotogramas……..40

Figura 13: 1º ensaio de viabilidade celular……. 42

Figura 14: 2º ensaio de viabilidade celular……. 43

Figura 15: Inibição da produção de nitritos em macrófagos (Raw 264.7) ……..45

Índice de tabelas

Tabela 1: Rendimentos dos óleos de *Thymus x citriodorus* em vários estudos. 4

Tabela 2: Composição dos óleos de *Thymus x citriodorus* em vários estudos..... 4

Tabela 3: Rendimentos dos óleos de *Thymus vulgaris* em vários estudos. 7

Tabela 4: Composição dos óleos de *Thymus vulgaris* em vários estudos. 8

Tabela 5- Diferentes metodologias de desinfeção realizadas. 26

Tabela 6: Número de explantes das diferentes espécies de *thymus* para os diferentes tipos de desinfeção 38

Tabela 7: Massa e rendimento do óleo essencial obtidos da amostra inicial. 39

Tabela 8: composição dos óleos 41

Tabela 9: Meio de cultura MS 1

Índice de equações

Equação 1 – Fórmula de cálculo do Rendimento 29

Equação 2: Índice de Kovats ou índice de retenção (RI). 31

Equação 3 – Fórmula de cálculo da percentagem da redução de Alamar blue 34

Equação 4: Fórmula de cálculo da percentagem da Inibição da produção de NO 35

Abreviaturas e símbolos

AB - Alamar blue

BAP – 6-Benzilaminopurina

CG/MS - Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrómetro de Massas

DMEM – Meio de cultura (*Dulbeco`s Modified Eagles Medium*)

DMSO - Dimetil sulfóxido

EDTA – Ácido etileno diamino tetra-acético

HBSS – Solução iónica de Hanks (do inglês *Hanks balanced salt solution*)

LPS - Lipopolissacarídeo

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

NAA - Ácido 1-naftalenoacético

NO - Óxido nítrico

RAW 264.7 – Linha celular de macrófagos de murganho (linha tumoral induzida pelo vírus da Leucemia Murina de Abelson)

rpm - Rotações por minuto

UV - Ultravioleta

1. Introdução

1.1. Plantas aromáticas e medicinais

Plantas aromáticas e medicinais são aquelas que para além de terem aroma, contêm num ou mais dos seus órgãos, óleos essenciais, sendo usadas pelas suas propriedades medicinais (Alves, 2013).

As plantas são um recurso renovável e abundante, o qual tem desempenhado desde há centenas de anos um papel muito importante nos cuidados da saúde, quer em países desenvolvidos quer em países em desenvolvimento. Possuem elevada bioatividade, com propriedades antioxidante, anti-inflamatória e antibacteriana, entre outras. O conhecimento sobre as mesmas tem sido passado de geração em geração (Nordine et al., 2013; Correia, 2014; Dakah et al., 2014).

Devido ao crescente número de problemas de saúde e à toxicidade associada ao uso excessivo de medicamentos sintéticos, tem havido uma maior procura de alternativas naturais tais como as plantas e os seus compostos. O que tem levado ao reforço do conhecimento das práticas de medicina tradicional através da identificação dos compostos e dos seus respetivos mecanismos de ação (Alves, 2013; Rodrigues, 2014).

Para além do uso medicinal e em tinturarias, perfumarias, cosméticos e bebidas, as plantas aromáticas e medicinais têm despertado também o interesse da indústria alimentar, principalmente as plantas da família Lamiaceae, devido às suas propriedades para conservar alimentos e atendendo à crescente procura dos consumidores por alimentos e condimentos naturais (Nordine et al., 2013; Dakah et al., 2014).

As plantas produzem normalmente metabolitos primários, os quais estão envolvidos nos processos metabólicos de sobrevivência tais como a fotossíntese e a respiração; e metabolitos secundários que desempenham funções de defesa e sinalização, nomeadamente na defesa contra predadores, pestes, prevenção de doenças, resposta a condições de stresse, atração de polinizadores, aumentando assim a sobrevivência da espécie. Estes metabolitos secundários conferem variada bioatividade às plantas, contribuindo para as variadas aplicações e interesse a nível científico. Os óleos essenciais são um exemplo de metabolitos secundários com uma vasta utilização (Alves, 2013; Rodrigues, 2014).

1.2. Género *Thymus*

A família *Lamiacea* é constituída por cerca de 300 géneros, e aproximadamente 7500 espécies distribuídas por todo o mundo. Nela inclui-se o género *Thymus* o qual é um dos oito mais importantes, que tem aproximadamente 220 espécies (Figueiredo et al., 2008; Ozudogru et al., 2011; Leal et al., 2017; Taghouti et al., 2018).

A designação tomilho inclui as plantas do género *Thymus* e ainda a espécie *Thymbra capitata* devido às suas grandes semelhanças com o género. O uso dos tomilhos como condimento é muito comum na gastronomia tradicional de países da região Mediterrânica, sendo muito utlizado pelas suas qualidades aromáticas e de preservação dos alimentos (Figueiredo et al., 2008; Ozudogru et al., 2011).

Para além disso o género *Thymus* tem sido documentado numa longa lista de propriedades farmacológicas, tais como, expetorantes, antissépticas, antimicrobianas, antioxidante, anti-inflamatória (Bandeira et al., 2007; Rubin et al., 2007; Tagami et al., 2009; Ozudogru et al., 2011; Mendes et al., 2012; Correia, 2014; Rodrigues, 2014; Martins-Gomes et al., 2018), contendo também valor ornamental, sendo a sua floração entre junho e agosto (Daneshvar-Royandezagh et al., 2009).

O tomilho é uma planta heliófila que resiste a condições extremas tais como, a aridez e o frio, condições características do mediterrânio e das terras altas, tendo por isso, folhas estreitas quase aciculares, minimizando assim a área foliar para evitar a perda de água. Contendo normalmente os órgãos cobertos de pelos de forma a diminuir a transpiração, sendo outra forma de evitar o excesso de transpiração a libertação de óleos essências através do rompimento dos tricomas, os quais vão evaporar-se e saturar o ar à volta da planta (Alves, 2013).

Os fenóis e os terpenos são particularmente característicos do género *Thymus* (Silva, 2014; Leal et al., 2017). Sendo que a composição química dos *Thymus* é influenciada pelo tipo de solo, clima, e fatores ecológicos, trazendo uma grande desvantagem, que é a heterogeneidade do material vegetal, tornando difícil o controlo por parte da indústria farmacêutica. Outro problema é o facto de que a necessidade de uma grande colheita de material no seu meio natural, leva rapidamente ao esgotamento desta. A necessidade de resolução destes dois problemas, leva-nos de encontro às técnicas de cultura *in vitro* de células vegetais, as quais, nos conseguem proporcionar uma grande quantidade de material vegetal em pouco tempo e na qual o ambiente, sendo controlado, tanto nos permite ter

colheitas fora da época como nos permite obter material homogéneo. Sendo por isso, a cultura *in vitro* uma boa alternativa ao cultivo tradicional (Arikat et al., 2004; Nordine et al., 2013; Dakah et al., 2014; Nordine et al., 2014; Leal et al., 2017).

1.2.1. *Thymus x citriodorus*

Nome Comum: Tomilho limão
Espécie: *Thymus x citriodorus*
Género: *Thymus*
Família: Labiatae (Lamiaceae)
Ordem: Lamiales
Classe: Magnoliopsida
Subclasse: Lamiidae
Divisão: Spermatophyta
Subdivisão: Magnoliophytina (Angiospermae)
Reino: Plantae
Domínio: Eucária

Figura 1: Thymus x citriodorus
(Jardim Botânico UTAD)

Thymus x citriodorus conhecido como tomilho limão originário do sul de Inglaterra é um híbrido entre o tomilho-poêjo (*Thymus pulegioides*) e o tomilho vulgar (*Thymus vulgaris*). As suas condições ideais são, uma boa exposição solar e solos calcários bem drenados (Omidbaigi et al.,2009; Silva, 2014).

O tomilho limão é um arbusto perene, semilenhoso, de pequeno porte atingindo 30 cm e contém um aroma a limão. As suas folhas são estreitas ovais e lanceoladas, de cor verde ou amarelas e brancas, a sua época de floração é em julho, sendo as flores brancas ou ligeiramente rosadas (Silva, 2014).

O geraniol é o composto maioritário dos óleos essenciais do tominho limão, seguido de carvacrol, acetato de geranilo, geranial e neral. O tomilho limão é muito utilizado, em infusões e saladas, e na indústria farmacêutica devido à sua bioatividade como antisséptico,

desodorizante, desinfetante e usado na aromaterapia para tratar a asma e outras complicações respiratórias (Horváth et al., 2006; Silva, 2014).

Existem vários estudos com *Thymus x citriodorus* tanto demonstrando a variada bioatividade dos seus óleos como as variações dos seus compostos e concentrações.

Relativamente aos rendimentos dos óleos existem algumas variações, sendo a maioria dos rendimentos calculados a partir de massa seca e muitas vezes só usando as folhas (Tabela 1).

Tabela 1: Rendimentos dos óleos de *Thymus x citriodorus* em vários estudos.

Rendimentos de extração dos óleos	**Estudo**
0,15%	Silva, 2014
0,36%	Horváth et al., 2006
1,4%	Omidbaigi et al., 2005
2%; 1,9%; 1,3% *	Toncer et al., 2017
2,22%; 1,45%; 1,66% *	Omidbaigi et al., 2009

*Rendimentos antes durante e depois da floração.

Na composição do óleo essencial de *Thymus x citriodorus* o componente maioritário, como referido anteriormente, costuma ser o geraniol (70%-50%), (Tabela 2). Sendo observado em um dos estudos variações da concentração dos compostos antes e depois da floração (Omidbaigi et al.,2009).

Tabela 2: Composição dos óleos de *Thymus x citriodorus* em vários estudos.

Compostos maioritários	**Estudo**
Geraniol e Geranial	Omidbaigi et al., 2009
Geraniol, Neral e Trans-cariofileno	Silva, 2014
Geraniol, Geranial e Neral	Omidbaigi et al., 2005; Horváth et al., 2006
Terpiolene, α-terpineol, Linalool, Bornyl acetate e borneol	Toncer et al., 2017

Os compostos estão do de maior concentração para o de menor.

1.2.2. *Thymus fragrantissimus*

Nome Comum: Tomilho laranja
Espécie: *Thymus fragrantissimus*
Género: *Thymus*
Família: Labiatae (Lamiaceae)
Ordem: Lamiales
Classe: Magnoliopsida
Subclasse: Lamiidae
Divisão: Spermatophyta
Subdivisão: Magnoliophytina (Angiospermae)
Reino: Plantae
Domínio: Eucária

Figura 2: Thymus fragrantissimus (Jelitto Perennial Seeds)

Thymus fragrantissimus conhecido como tomilho laranja, é um híbrido do tomilho vulgar (*Thymus vulgaris*), sendo um tomilho proveniente da zona do mediterrânio. As suas condições ideais são uma boa exposição solar e solos bem drenados.

O tomilho laranja é um arbusto perene, semilenhoso, de pequeno porte atingindo 30 cm de altura, contém aroma a laranja. As suas folhas são estreitas ovais e lanceoladas, de cor verde ou amarelas e brancas, a sua época de floração é em junho- julho sendo as suas flores rosadas.

O tomilho laranja é utilizado em chás e saladas, e na indústria farmacêutica devido à sua bioatividade como antisséptico, desodorizante ou desinfetante. Existem poucos estudos com *Thymus fragrantissimus*, nos quais é demonstrada atividade inseticida (Pavela, 2010), antioxidante e antibacteriana (Afonso et al., 2018).

1.2.3. *Thymus vulgaris*

Nome Comum: Tomilho vulgar
Espécie: *Thymus vulgaris*
Género: *Thymus*
Família: Labiatae (Lamiaceae)
Ordem: Lamiales
Classe: Magnoliopsida
Subclasse: Lamiidae
Divisão: Spermatophyta
Subdivisão: Magnoliophytina (Angiospermae)
Reino: Plantae
Domínio: Eucária

Figura 3: Thymus vulgaris (Jardim Botânico UTAD)

Thymus vulgaris conhecido como tomilho vulgar é nativo da região do Mediterrânio e Ásia. Sendo atualmente cultivado em quase todos os continentes. Habita principalmente em regiões secas, áridas, expostas ao sol, com solos arenosos e calcários, sendo que esta é uma planta de solos pobres, rústica, que evita a humidade e terras compactadas (Goodner et al., 2006; El-Nekeety et al., 2011; Rocha, 2011; Silva, 2014).

O tomilho é uma planta semilenhosa, subarbustiva de pequeno porte, cerca de 15 a 40 cm de altura com quase o dobro de largura. É uma planta ramificada, retorcida com ramos leves e cobertos de pelos brancos e folhas pequenas, lineares, ovaladas e opostas. A sua época de floração é entre maio e julho, apresentando flores arroxeadas (Guillén and Manzanos, 1999; Goodner et al., 2006; Silva, 2014).

O timol é o composto maioritário da composição química do óleo essencial do *Thymus vulgaris*, seguido pelo carvacrol, o *p*-cimeno e o γ-terpineno, além destes compostos esta espécie também contém geraniol, linalol, α-terpineol, 1-8-cineol, cimol, borneol, cineno, pineno. Existindo varios quimiotipos diferentes geraniol, linalool, α-terpineol, carvacrol, timol, 1,8-cineole e *p*-cymene. É uma planta muito usada na indústria alimentar devido ao seu sabor e poder conservante e na indústria farmacêutica devido à sua variada bioatividade antimicrobiana, carminativa, expetorante, espasmolítica, diurética e antioxidante (Guillén and

Manzanos, 1999; Tagami et al., 2009; Santos et al., 2010; El-Nekeety et al., 2011; Hussain et al. 2011; Borugă et al., 2014; Nikolić et al., 2014; Romero et al., 2014; Silva, 2014; Mancini et al., 2015; Satyal et al., 2016; Ambindei et al., 2017).

Existem vários estudos com *Thymus vulgaris* demonstrando a bioatividades dos seus óleos e a variação dos seus compostos e respetivas concentrações.

Relativamente aos rendimentos dos óleos existem algumas variações, sendo a maioria dos rendimentos calculados a partir de massa seca e muitas vezes só usando as folhas (Tabela 3).

Tabela 3: Rendimentos dos óleos de *Thymus vulgaris* em vários estudos.

Rendimentos de extração dos óleos	**Estudo**
0,83%-1,39%	Nezhadali et al., 2014
0,32%	Silva, 2014
0,49%	Horváth et al. 2006
1,25%	Borugă et al., 2014
1,4%	Romero et al., 2014
1,86%	Jakiemiu, 2008; Jakiemiu et al., 2010
0,068; 0,07; 0,092; 0,019 e 0,081% (Diferentes localizações)	Mancini et al., 2015
0,15% (plantas com 5 anos); 0,52-0,50% junho a agosto e 1,21% Dezembro	Hudaib et al., 2002

O *Thymus vulgaris* apresenta uma grande variedade de composições químicas (quimiotipos), sendo a mais conhecida e mais importante a do timol (Tabela 4).

Tabela 4: Composição dos óleos de *Thymus vulgaris* em vários estudos.

Compostos maioritários	Estudo
Timol, *p*-cimeno e *γ*- terpineno	Hudaib et al., 2002; Horváth et al., 2006; Jakiemiu, 2010; Hussain et al., 2011; Borugă et al., 2014; Nezhadali et al., 2014; Nikolić et al., 2014; Romero et al., 2014; Silva, 2014; Ambindei et al., 2017;
Carvacrol, *p*-cimeno e α-pineno	Santos et al., 2010
Borneol, carvacrol e α-terpineol (planta seca) **Timol e *p*-cimeno (planta fresca)**	Jakiemiu, 2008
Carvarcrol, timol, b-felandreno e linalool	El-Nekeety et al., 2011
Timol, canfeno, cariofileno, humulene, α-terpeniol e *p*-cimeno	Al-Asmari et al., 2017
Timol, carvacrol, óxido de cariofilen	Mancini et al., 2015

Os compostos estão do de maior concentração para o de menor.

1.3. Óleos essenciais

Os óleos essenciais são constituídos por misturas complexas de compostos voláteis de baixo peso molecular que apresentam odor forte, densidade inferior à da água, aspeto oleoso e variada bioatividade (Santos et al., 2010; Bayala et al., 2014; Rodrigues, 2014).

A composição química e a concentração dos óleos essenciais depende muito do clima, da estação do ano, das condições geográficas, do período de colheita e da técnica de extração usada (Figueiredo et al., 2008; Santos et al., 2010; Silva, 2014).

Alguns estudos, demonstram que há um maior rendimento de óleo em plantas cultivadas *in vitro*, relativamente às cultivadas pelo método tradicional, devendo-se isto tanto ao facto dos rebentos mais jovens acumularem maiores concentrações de óleos, como ao facto da possibilidade do uso de elicitadores para aumentar a produção de óleo (Arikat et al., 2004).

Existem muitos fatores intrínsecos e extrínsecos, que influenciam a biossíntese de óleos essenciais conferindo-lhes variabilidade química na sua composição. Desta forma, plantas da mesma espécie podem produzir óleos essenciais com composição química diferente. Na maioria das vezes, estas diferenças quantitativas e qualitativas são acentuadas, podendo-se por isso diferenciar em vários quimiotipos ou variedades químicas (Alves, 2013).

O estádio de desenvolvimento dos órgãos das plantas é muitas vezes determinante no rendimento e na composição dos óleos essenciais. Sendo que, muitas vezes, na fase de maturação do botão floral existe um aumento do rendimento dos óleos, juntamente com mudanças na sua composição, nas quais os compostos vestigiais representam normalmente 10% do oléo, podendo aumentar até 50-70%. Noutros casos, pode acontecer o contrário e em certa fase haver uma diminuição do rendimento e da composição, estando estas mudanças relacionadas com as vias biossintéticas dos óleos e dos órgãos (Figueiredo et al., 2006).

Os óleos são produzidos e armazenados em órgãos secretores especializados, internos ou externos, diversamente distribuídos. O tipo e a localização destes órgãos são, por norma, característicos da família da planta (Figueiredo et al., 2008; Silva, 2014).

A libertação de óleos essenciais pode acontecer normalmente devido a fatores abióticos como o clima, ou fatores bióticos como é o caso de predadores e microrganismos.

Na presença de predadores, a libertação de óleos forma uma barreira protetora, pois a toxicidade de alguns componentes serve de repelente tanto para herbívoros como para insetos. No caso dos microrganismos, alguns compostos servem como antibacterianos e antifúngicos, inibindo a germinação e crescimento destes (Alves, 2013).

1.3.1. Composição e biossíntese

Os metabolitos secundários distribuem-se por 3 grandes grupos: os terpenos, os compostos fenólicos e os alcaloides, tendo cada um as suas biossínteses e as suas características. Os terpenos são os compostos mais comuns nos óleos essenciais e dentro destes enquadram-se os monoterpenos e os sesquiterpenos (Bayala et al., 2014; Rodrigues, 2014; Silva, 2014).

1.3.1.1. Terpenos

Os terpenos são o grupo com maior número de substâncias descritas e também com a maior variedade. São produzidos, em parte, como defesa contra microrganismos e insetos, sendo que quando contêm oxigénio chamam-se terpenóides (Silva, 2014).

Os terpenos são formados a partir do ácido mevalónico, no citoplasma, ou do piruvato e 3-fosfoglicerato, no cloroplasto e apresentam uma grande diversidade estrutural derivada da fusão de unidades de cinco átomos de carbono (C5) denominadas isoprenos. Podem ser classificados como hemiterpenos (C5), monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), sesterpenos (C25), triterpenos (C30), tetraterpenos (C40) e politerpenos (Bayala et al., 2014; Rodrigues, 2014; Silva, 2014).

A biossíntese dos terpenos começa com a condensação do pirofosfato de isopentenilo (PPI) e o seu isómero o pirofosfato de dimetilalilo (PPDMA), tendo ambos 5 átomos de carbono, que são produtos da via do acetatomevalonato. A sua junção, origina um composto intermediário em C10, o pirofosfato de geranilo, percussor imediato dos monoterpenos, podendo haver novas condensações com outras unidades de PPI formando novos intermediários, o pirofosfato de farnesilo (C15) precursor dos sesquiterpenos, pirofosfato de geranilgeranilo (C20) precursor dos diterpenos e terpenóides (Figuras 4 e 5), sendo estes menos frequentes nos óleos essenciais (McGarvey and Croteau, 1995; Rodrigues, 2014).

Grande parte dos compostos terpénicos apresenta atividade anti-inflamatória, expetorante e antimicrobiana (Silva, 2014).

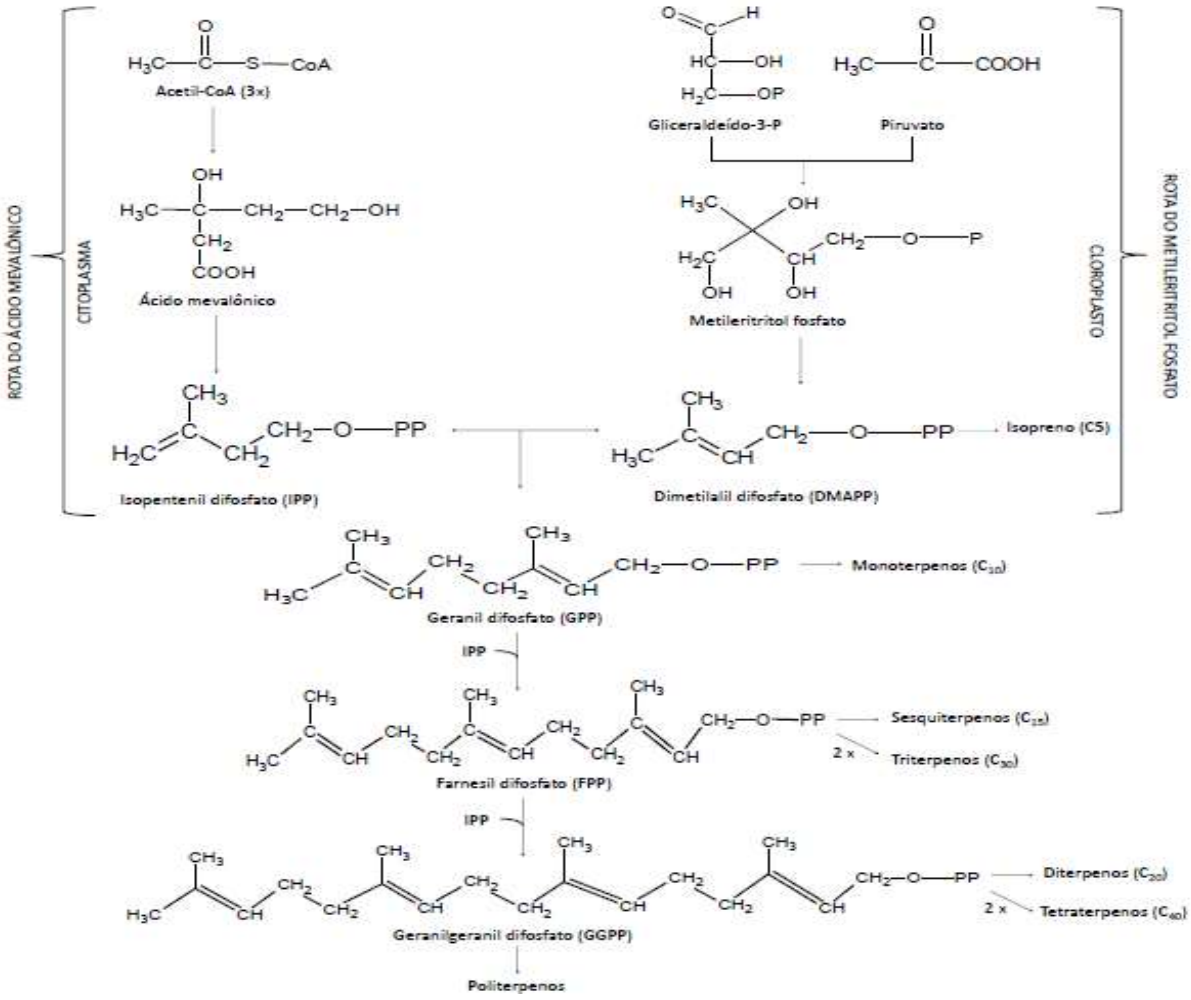


Figura 4: Biossíntese dos terpenos (Martins, 2012).

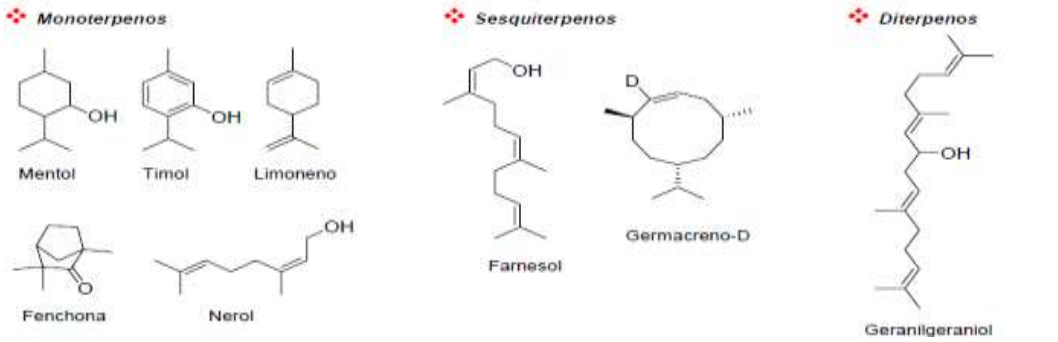


Figura 5: Alguns exemplos de terpenos (Figueiredo et al., 2006).

1.3.1.2. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são derivados da fenilalanina e tirosina, que são compostos de estrutura simples contendo um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxilos. Possibilitam aos compostos fenólicos, eliminar e estabilizar radicais livres, reduzir o oxigénio singleto, atuar nas reações de oxidação lipídica e também são capazes de modular a atividade de muitas enzimas, sendo por isso uma classe com propriedades antioxidante. Os compostos fenólicos formam-se maioritariamente em condições de stresse, como infeções, lesões, radiações UV, entre outras. Podem ser citados três grupos principais de compostos fenólicos: ácidos fenólicos, flavonoides e taninos. Os compostos fenólicos têm propriedades farmacológicas comprovadas no ser humano, tais como atividade anti-inflamatória, antioxidante, antialérgica e anti-cancerígena (Martins, 2012; Silva, 2014).

1.3.1.3. Alcaloides

Alcaloides são compostos nitrogenados de baixo peso molecular, sintetizados no reticulo endoplasmático que tem características alcalinas, o que facilita o isolamento e a purificação destes compostos. Estes são sintetizados através de reações de descarboxilação de aminoácidos, tais como ornitina, lisina, ácido nicotínico, tirosina, triptofano entre outros. Durante a sua biossíntese as enzimas triptofano descarboxílase e tirosina descarboxílase transformam os aminoácidos em percursores de alcaloide, desviando-os da síntese proteica.

Os alcaloides em elevadas concentrações são muito tóxicos tendo sido usados como venenos desde há muito tempo, no entanto em baixas concentrações podem ser benéficos devido à sua interação com neurotransmissores, agindo como relaxantes, analgésicos e tranquilizantes. Alguns exemplos de alcaloides são, a morfina, cocaína, nicotina e a cafeína, sendo esta última provavelmente o alcaloide mais consumido em todo mundo (Martins, 2012).

1.3.2. Importância económica

Os óleos essenciais são utilizados em diversos setores desde a antiguidade, como por exemplo, no fabrico de fármacos, de perfumes, de cosméticos, de produtos de higiene e limpeza e em aditivos para alimentos e bebidas. São muito utilizados nas bebidas e comidas

devido aos seus aromas, dando à comida e a vários vinhos um sabor distinto, sendo também relevante o seu poder conservante (Figueiredo et al., 2006; Silva, 2014).

Na agricultura os óleos essenciais são muito utilizados como inseticida, fungicida e antibacteriano. Na indústria farmacêutica são usados indiretamente para influenciar o odor e o sabor de medicamentos administrados por via oral ou então diretamente, sendo a planta ou parte desta, usada para tratar algum problema como por exemplo anti-inflamatório (Rodrigues, 2014).

O valor dos óleos essenciais depende da sua qualidade, a qual é diretamente influenciada pela sua composição rica em terpenos. No entanto, existem vários fatores que fazem com que não haja uma produção homogénea e continua dos óleos, sendo por isso importante, um maior controlo da produção de plantas aromáticas e medicinais (Figueiredo et al., 2006; Rodrigues, 2014).

As principais famílias produtoras de óleos essenciais são as Apiaceae, Asteraceae, Geraniaceae, Lamiaceae, Pinaceae, Rutaceae e Verbenaceae (Figueiredo et al., 2006; Rodrigues, 2014). Estima-se que a produção mundial de óleos essenciais seja superior a 42.000 toneladas sendo que uma grande parte provém de plantas selvagens, que a longo prazo ameaçam algumas populações de plantas, uma vez que a colheita nem sempre é feita de forma sustentável (Rodrigues, 2014).

1.3.3. Bioatividade

O uso dos óleos essenciais tem sido praticado tradicionalmente, por todo mundo, no tratamento de várias doenças tais como cardiovasculares, inflamatórias, intestinais, artrite, diabetes, alergias, esclerose múltipla e doenças neurodegenerativas, entre outras. Essa prática deve-se à diversificada bioatividade que é atribuída aos óleos: antioxidantes, bactericidas, fungicidas, antivirais, antiparasitárias, inseticidas, anti-inflamatórias. Esta bioatividade, muitas vezes, não é devida a um composto apenas, mas sim, à interação entre vários compostos, havendo sinergias entre eles (Rodrigues, 2014).

A atividade antimicrobiana é uma das mais estudadas, geralmente associada à presença de pequenas moléculas oxigenadas, capazes de estabelecer pontes de hidrogénio, exemplos do timol, do carvacrol, do eugenol, do lianalol, do geraniol, ou do geranial, atuando geralmente através de modificações da membrana externa dos microrganismos e por inibição

de enzimas da cadeia respiratória, comprometendo o equilíbrio energético da célula (Rodrigues, 2014).

1.3.4. Extração dos óleos essenciais

Existem vários métodos de extração de óleos essenciais, tendo cada um as suas vantagens e desvantagens, sendo uma dessas as variações na composição dos óleos. Dentro dos métodos de extração os mais tradicionais e também os mais usados, são a hidrodestilação e a destilação de arraste por vapor. Sendo que, na hidrodestilação o material a ser destilado permanece em contacto direto com a água em ebulição, enquanto no método de arraste de vapor o material a destilar é colocado sobre uma placa perfurada, evitando assim o contacto direto com a água em ebulição (Borsato et al., 2008; Steffens, 2010).

Neste trabalho, utilizamos o método de destilação de arraste por vapor, o qual é simples, não necessita de equipamento sofisticado e é económico, podendo ser realizada a extração numa única vez em quantidades significativas de material vegetal. No entanto, também tem os seus inconvenientes, os constituintes dos óleos essenciais podem sofrer degradação térmica, hidrólise o que pode alterar as suas propriedades bioativas e o aroma do extrato (Borsato et al., 2008; Steffens, 2010).

O método de destilação de arraste por vapor é um sistema constituído por um recipiente com água a ferver que injeta vapor em outro recipiente, no qual se encontra o material vegetal para extração. Na sua passagem pelo recipiente que contém o material vegetal, o vapor de água fica misturado com os compostos voláteis (óleos essenciais) do material vegetal. O vapor é arrefecido, condensando, obtendo-se uma mistura líquida de óleos essenciais e água, num recipiente. Após algumas horas de repouso, os óleos essenciais separam-se da água devido às diferenças de densidade, formando-se duas fases, óleo (fase orgânicas) e hidrolato (fase aquosa), as quais podem ser finalmente separadas (Edris et al., 2003; Richter and Schellenberg, 2007; Borsato et al., 2008).

1.3.4.1. Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrómetro de Massas

Durante as últimas décadas, um dos métodos mais eficientes usado no estudo da composição dos óleos essenciais é a cromatografia gasosa acoplada ao espectrómetro de massa (CG/MS). É um bom método para a identificação devido aos componentes do óleo

serem compostos voláteis de baixo peso molecular. O óleo essencial é injetado no cromatógrafo, sem necessidade de tratamento prévio, o qual elimina possíveis modificações na composição da amostra ou na estrutura de seus constituintes. No cromatógrafo, os componentes do óleo essencial são separados e, em seguida, penetram no espectrómetro de massas, que permite registrar o correspondente espetro de cada um dos compostos separados. Os constituíntes do óleo essencial são identificados por comparação dos espetros obtidos com os de padrões, quer obtidos no laboratório, quer disponíveis na literatura (Steffens, 2010).

A cromatografia é um método físico de separação. Esta técnica baseia-se na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações, entre duas fases imiscíveis, a fase móvel que é um fluido, que percola através da fase estacionária que é fixa e de grande área superficial (Degani et al., 1998). A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias torna a técnica extremamente versátil e de grande aplicação. Os métodos cromatográficos podem ser classificados em dois grandes grupos: cromatografia liquida, quando a fase móvel for um líquido e cromatografia gasosa quando a mesma for um gás (Lanças and McNair, 1983).

O espectrómetro de massa é um detetor para as análises qualitativas e quantitativa de constituíntes em cromatografia gasosa ou líquida. Na espetrometria de massa, as moléculas gasosas são ionizadas, geralmente para formar catiões, aceleradas por um campo elétrico e separadas de acordo com a sua massa. O processo de ionização, geralmente, confere energia suficiente para quebrar a molécula numa variedade de fragmentos. Um espetro de massa é um gráfico que mostra a abundância relativa de cada fragmento que atinge o detetor do espectrómetro de massa (Steffens, 2010).

1.4. Cultura *in vitro* de células animais

A cultura de células animais é um processo através do qual as células são cultivadas em condições controladas e de assepsia, de forma a proporcionar o seu crescimento e proliferação. Sendo que, o meio de cultura proporcionado às células contém todos os nutrientes necessários a estas, tais como aminoácidos, sais e vitaminas, havendo variações dependendo da linha celular usada, e finalidade (Mericko et al., 2001; Silva, 2014).

A cultura de células animais, é uma técnica que tem uma grande variedade de aplicações, sendo algumas, a identificação de propriedades da proliferação normal e anormal das células, a produção de vários compostos de genes da própria ou introduzidos, testes de

alterações genéticas das células e testes da bioatividade de compostos, como é o caso do teste de citotoxicidade e da atividade anti-inflamatória realizados neste trabalho.

Existem dois tipos principais de linhas celulares, as linhas de células primárias, as quais têm um limite de crescimento e proliferação, e as linhas de células imortalizadas, que têm uma proliferação contínua anormal, mas no entanto podem ter perdido algumas das características iniciais (Mericko et al., 2001).

As células organizam-se normalmente em monocamadas, sendo que estas vão se multiplicando até não terem espaço e parando de crescer quando isso acontece. Assim, verifica-se ser necessário uma renovação do espaço e do meio de cultura, para que estas continuem a crescer, realizando-se assim uma manutenção da cultura, a qual varia consoante a linha celular. A subcultura, normalmente, envolve a remoção do meio de cultura velho, a lavagem e dissociação das células, seguido de uma diluição destas em meio novo. A sua dissociação está dependente do grau de adesão das células à caixa de cultura, sendo esta característica da linha celular usada. Dependendo do grau de adesão, pode bastar um pouco de força mecânica para dissociar e realizar a subcultura das células, ou então em casos de maior aderência das células o uso de uma solução de tripsina com EDTA, realizando-se uma dissociação por ação enzimática, a qual pode ser prejudicial para algumas linhas celulares (Mericko et al., 2001; Silva, 2014).

1.4.1. Células RAW 264.7

A linha celular RAW 264.7, que foi usada neste trabalho, é a linha de macrófagos mais usada em investigações médicas, tendo uma grande eficiência na avaliação de infeções relacionadas a mediadores pro-inflamatórios.

RAW 264.7 é uma linha celular estabelecida a partir de um tumor de murganho causado pelo vírus da leucemia Abelson. Sendo por isso, uma linha já imortalizada, mantendo estas as propriedades normais dos macrófagos, tais como a produção de óxido nítrico (NO), a qual vai ser utilizada para testar a atividade anti-inflamatória dos óleos (Raschke et al., 1978; Hartley et al., 2008).

1.4.2. Avaliação da citotoxicidade

O ensaio de viabilidade celular é muito utilizado em ensaios de citotoxicidade, proliferação, viabilidade celular e determinação da função mitocondrial (Nociari et al., 1998; O'Brien et al., 2006).

A utilização de ensaios *in vitro* de citotoxicidade, permite-nos obter informações importantes no início de testes em linhas celulares, identificando potenciais compostos citotóxicos e/ou em que quantidade podem ser tóxicos para as células, atendendo a que as várias linhas celulares reagem de maneiras diferentes e a quantidades diferentes. A escolha de um método é complicada devido à existência de vários ensaios diferentes dependentes de diferentes mecanismos fisiológicos. No entanto, nenhum destes ensaios pode prever com segurança a toxicidade *in vivo*, sendo esta uma propriedade difícil de avaliar (Hamid et al., 2004).

Este ensaio foi realizado pelo método em microplaca utilizando o Alamar blue (AB), um corante de oxidação/redução que serve como indicador de crescimento e/ou viabilidade celular. Sendo o Alamar blue, um corante bastante estável e não tóxico para as células, permite uma monitorização contínua das culturas ao longo do tempo, sendo por isso muitas vezes considerado superior aos testes clássicos como o caso do MTT (Brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), no qual há morte das células, não podendo haver seguimento.

A resazurina, componente ativo do AB, é azul e não fluorescente na forma oxidada (com absorção a 570 nm) e converte-se, após a redução em resorufina de cor rosa e fluorescente (com absorção a 620 nm). O AB é captado pelas células vivas e é reduzido pelas enzimas mitocondriais de células viáveis, daí que seja um indicador direto da atividade mitocondrial da célula. Há uma correlação direta entre a redução do AB no meio de crescimento e a quantidade/proliferação de organismos vivos. Podendo ser estimado indiretamente o número de células a partir de uma associação colorimétrica ou fluorométrica (Nociari et al., 1998; Hamid et al., 2004; Ribeiro et al., 2004; O'Brien et al., 2006; Al-Nasiry et al., 2007; Andreani et al., 2014).

1.4.3. Atividade anti-inflamatória

A inflamação é uma resposta biológica do organismo para combater corpos estranhos (vírus, bactérias, fungos e parasitas) e no caso de células mortas ou danificadas, ocorrendo a remoção destas. No processo inflamatório os macrófagos destacam-se devido à sua importância, na produção de mediadores pró-inflamatórios, sendo estes o óxido nítrico (NO), as prostaglandinas e as citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF-α) e interleucina (IL)-1ß. Sendo os mediadores sintetizados devido à ativação das formas induzíveis da sintase do NO (iNOS), responsável pela biossíntese de NO através da oxidação da L-arginina, e da ciclo-oxigenase (COX-2), catalisadora da síntese de prostaglandina E2 (PGE2) pela metabolização do ácido araquidónico. A produção e libertação destes mediadores pro-inflamatórios pode ser estimulada por lipopolissacarídeo (LPS) da membrana de bactérias Gram-negativas (Miguel, 2010; Alves, 2013; Zuzarte et al., 2013; Correia, 2014; Rodrigues, 2014; Martins-Gomes et al., 2018).

Com o aumento de incidências de doenças relacionadas com a inflamação e as dificuldades encontradas no tratamento destas, tais como o aumento da resistência às drogas, os seus efeitos colaterais e os seus custos, tem levado à procura de novas opções mais efetivas, baratas e menos tóxicas. Posicionando-se os óleos essenciais numa alternativa viável, havendo já vários estudos a reportar a atividade anti-inflamatória de vários óleos, sendo esta relacionada direta ou indiretamente com os mediadores pró-inflamatórios (Alves, 2013; Zuzarte et al., 2013; Correia, 2014).

Neste trabalho, foi usado um modelo *in vitro* de macrófagos estimulados por LPS de forma a avaliar a produção de óxido nítrico (NO) pela deteção da acumulação de nitritos nos sobrenadantes das culturas celulares, utilizando uma reação colorimétrica com recurso ao reagente de Griess (Green *et al.*, 1982; Cruz *et al.*, 2001). Nesta reação, são usadas a sulfanilamida e a com *N*-(1-naftil)-etilenodiamina que ao reagir em condições acídicas vão detetar NO_2^- (Figura 6).

Depois de lida a absorbância a 560 nm passado 10 minutos da reação, a quantidade de óxido nítrico (NO) deve ser calculada com base em uma curva padrão de referência (Promega, 2009).

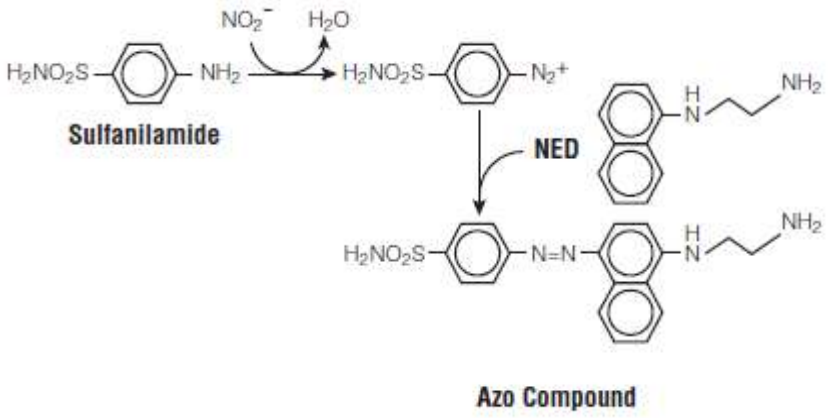


Figura 6: Reações químicas envolvidas na medição do NO_2^- usando os Reagentes Griess (Promega 2009).

1.5. Cultura *in vitro* de células vegetais

A cultura *in vitro* de células vegetais é uma técnica que permite o crescimento de células, tecidos ou órgãos de plantas em meio sintético, num ambiente com luz e temperatura controladas e em condições de assepsia. A micropropagação tem muitas vantagens relativamente à propagação convencional. Por exemplo, a elevada e contínua taxa de multiplicação num período de tempo relativamente curto, a necessidade de pouco espaço, o controlo do ambiente proporcionando as melhores condições para o seu crescimento, e as plantas resultantes serem iguais à planta mãe - clones. No entanto, também existem algumas desvantagens tal como a necessidade de trabalhadores especializados, os elevados custos de investimento, a manutenção do laboratório e a necessidade das plantas micropropagadas serem fortalecidas antes da passagem para campo (George et al., 2008).

O sucesso da cultura *in vitro* de células vegetais depende muito da assepsia do ambiente, dos meios utilizados, sendo que estes variam consoante a planta utilizada e o objetivo. A utilização de um explante maior ou menor na micropropagação faz grande diferença, sendo que um explante maior tem maior probabilidade de se adaptar ao ambiente de cultura *in vitro*, no entanto, também há maior probabilidade de conter contaminações.

As plantas que crescem num ambiente externo estão contaminadas com microrganismos, que iriam competir com estas pelos nutrientes acabando por levar à morte dos explants. Por essa razão, é necessário uma desinfeção das plantas antes de serem colocadas *in vitro* e a sua permanência em condições de assepsia (Rout et al, 2000; George et al, 2008).

Os meios de cultura são uma solução aquosa constituída por macronutrientes como azoto (N), fosforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e o enxofre (S), micronutrientes como Ferro (Fe), zinco (Zn), boro (B) e cobre (Co), entre outros, fonte de carbono sendo a mais utilizada a sacarose, vitaminas, aminoácidos, agentes polimerizadores como o agar e reguladores de crescimento, sendo que a concentração de cada um depende da finalidade da cultura (Rout et al, 2000; George et al, 2008; Saad and Elshahed, 2012).

Existem vários métodos de micropropagação (Figura 7), tendo neste trabalho sido efetuada a partir de segmentos nodais. São consideradas 4 etapas principais:

Etapa 0 – Seleção e preparação da planta mãe. Na qual se selecionam as plantas mãe que não deverão apresentar sintomas de infeções, sendo realizada uma desinfeção.

Etapa I – Estabelecimento da cultura em condições de assepsia. Nesta etapa o objetivo é conseguir obter explantes *in vitro* que sobrevivam à mudança para o meio de cultura e estejam livres de qualquer tipo de contaminação.

Etapa II – Produção de propágulos sustentáveis. O objetivo desta etapa é a produção de novas plantas a partir da fragmentação do material inicial, podendo esta etapa ser repetida inúmeras vezes.

Etapa III – Preparação para o crescimento em ambiente natural. Esta etapa ocorre em vários passos, com o objetivo das plantas da etapa II se tornarem autotróficas.

Etapa IV – Transferência para ambiente natural. Esta é uma fase muito importante na qual as plantas passam das condições *in vitro* para o exterior. Se não se tiverem certos cuidados (diminuição gradual da humidade, adaptação a luminosidade e substrato) pode resultar numa enorme perda de plantas (George et al, 2008).

Neste estudo foram utilizadas apenas as duas primeiras etapas.

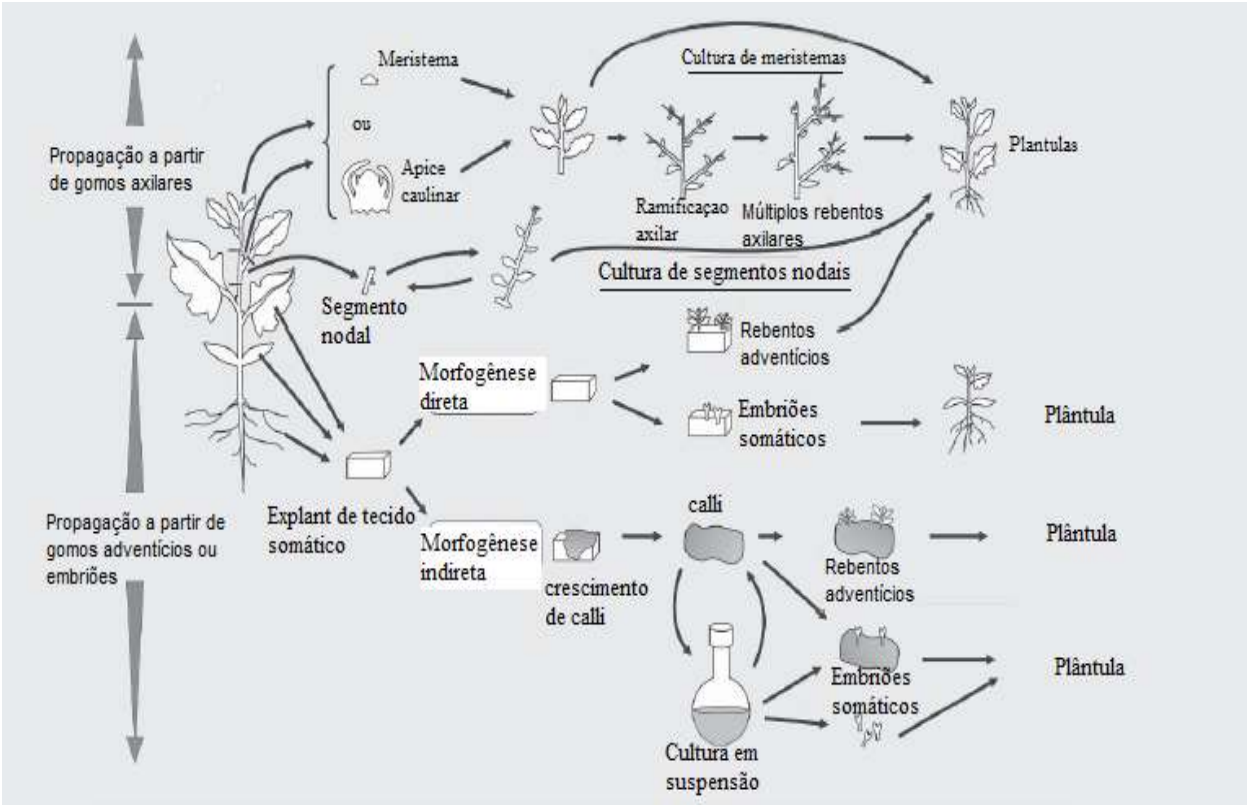


Figura 7: Principais métodos de micropropagação (adaptado de George et al, 2008).

2. Objetivos

O principal objetivo deste trabalho foi comparar os extratos obtidos (óleos essenciais) em termos de composição química e de efeitos biológicos, usando células em cultura, de três espécies de tomilho, *Thymus citriodorus* e *Thymus fragrantissimus, Thymus vulgaris*.

Mais especificamente ao longo deste trabalho pretendeu-se:

-Estabelecer em cultura *in vitro* as três espécies de tomilho;

- Extrair os óleos essenciais;

- Avaliar a composição química dos óleos por GC-MS;

- Avaliar a bioatividade dos óleos essenciais, nomeadamente:

    - Citotoxicidade pelo método de Alamar Blue

    - Atividade anti-inflamatória pela libertação de óxido nítrico quantificada pelo método de GREISS e com utilização de células RAW 264.7 (linha celular de macrófagos de murganho).

3. Material e métodos

3.1. Origem do material vegetal

Neste estudo foram utilizados 3 espécies de tomilho (*Thymus x citriodorus*, *Thymus fragrantissimus* e *Thymus vulgaris*) que foram adquiridas em fevereiro, à empresa ERVITAL (ERVITAL- Plantas Aromáticas e Medicinais, Lda; Mezio Castro Daire, Portugal) e foram produzidos em condições de produção biológica. Entre a sua colheita e utilização, as amostras foram congeladas a uma temperatura de -20 °C.

3.2.Cultura de células vegetais

3.2.1. Manutenção e manuseamento

A maioria dos procedimentos foram realizados, em condições de assepsia, numa bancada de fluxo laminar horizontal. Esta é ligada 30 minutos antes da sua utilização e desinfetada com a passagem de papel absorvente com um pouco de etanol 96% com movimentos paralelos, de forma a minimizar possíveis fontes de contaminação.

Com uma ou duas lamparinas de álcool, esteriliza-se o material de manipulação dos explantes: pinças e bisturis são flamejados e arrefecidos antes e entre qualquer contacto com os explantes.

Durante a permanência *in vitro* os frascos com o material em cultura foram colocados numa câmara de crescimento WalkIn, a uma temperatura constante de 24ºC e um fotoperíodo de 16 horas de luz.

3.2.2. Meios de cultura

Um método conveniente para a preparação dos meios de cultura, é a realização de soluções *stock* concentradas, que podem ser diluídas até à concentração pretendida, imediatamente antes da sua preparação. As soluções estão armazenadas num frigorífico entre 2-4ºC. A solução utilizada (x10) de meio cultura foi MS (M0222 Duchefa®) Murashige & Skoog (anexo1).

Foram utilizados 2 meios de cultura durante este trabalho, ambos baseados na formulação MS (Murashige and Skoog 1962), com e sem reguladores de crescimento.

Em ambos os meios utilizou-se 20 g/L de sacarose, 100 mL/L de solução *stock* (x10) e 7,5 g/L de agar, ao que contém reguladores de crescimento é acrescentado 1 mL/L BAP (6-benzilaminopurina) e 0,5 mL/L NAA (ácido 1-naftalenoacético). Após a adição dos diferentes componentes, exceto agar, o pH do meio de cultura é ajustado a 5,7. Por último, é adicionado o agar e o meio de cultura é autoclavado a 121 ºC durante 15 minutos. A distribuição do meio para frascos esterilizados é feita na bancada de fluxo laminar horizontal, enquanto este ainda está quente.

3.2.3. Desinfeção e estabelecimento dos explantes em cultura

Foram efetuadas diferentes metodologias de desinfeções, com pequenas variações na concentração ou tipo de agente desinfetante. Em todos os processos ocorreu passagem do material vegetal por água corrente durante 5 minutos, seguida de um banho com agitação em solução hipoclorito de sódio 5% cloro ativo (lixívia comercial, diluída em água esterilizada (v/v)) e ou fungicida (cuprocoffaro: anexo 2), e por fim passagem por água esterilizada 3x 10 minutos. (Tabela 5)

Tabela 5- Diferentes metodologias de desinfeção realizadas.

Desinfeção		T.C.	T.F.	T.V.
1º	Lixívia 2:3, 30 minutos	10 Frascos	14 Frascos	10 Frascos
	Lixívia 2:3, 30 minutos + Fungicida 6 g/L 30 minutos	10 Frascos	----------	10 Frascos
2º	Lixívia 2:3, 30 minutos	7 Frascos	----------	7 Frascos
	Lixívia 2:3, 45 minutos	7 Frascos	22 Frascos	7 Frascos
	Lixívia 3:2, 30 minutos	7 Frascos	----------	7 Frascos
3º	Lixívia 2/3, 45 minutos	----------	----------	17 Frascos

Lixivia 2:3 é uma mistura de 2 partes de lixívia e 3 partes de água; T.C (*Thymus x citriodorus)*,T.F. (*Thymus fragrantissimus)* e T.V. (*Thymus vulgaris).*

Depois de desinfetado, o material vegetal foi cortado de forma a obter explantes de 1 a 3 cm comprimento, sendo colocados 3 explantes por cada frasco nos quais foram identificadas a data, espécie de tomilho, meio de cultura e método de desinfeção usado.

3.3. Extração dos óleos essenciais

Utilizou-se aproximadamente 500 g de massa total (caules e folhas) para cada espécie de tomilho, sendo os óleos extraídos usando destilação de arraste por vapor, durante 4-5 h. (Figura 8)

Recolheu-se o produto da destilação e separou-se a fase aquosa da fase orgânica, recorrendo primeiro a uma centrifugação a 4000 rpm durante 10 minutos para haver uma melhor separação das fases. O óleo, com algum hidrolato foi recolhido com o auxílio de uma pipeta, sendo de seguida colocado num funil de separação com um solvente (clorofórmio) de forma a haver uma separação mais precisa sem se desperdiçar óleo e não haver vestígios de água, sendo o subnadante extraído para um balão em pera. O clorofórmio foi evaporado, ficando só o óleo que foi pesado e colocado num tubo de vidro e por fim congelado a –20 °C. (Figura 9)

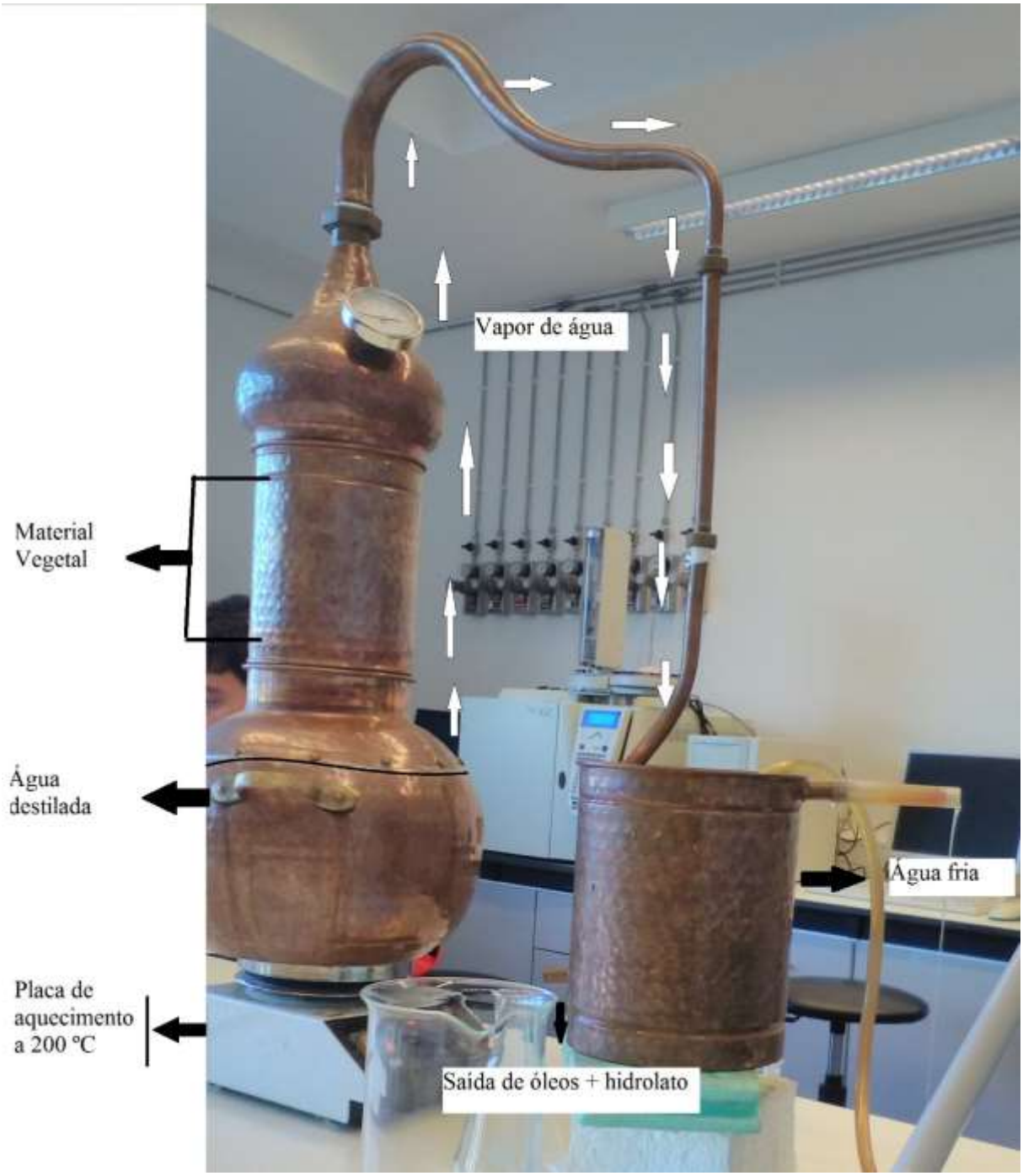


Figura 8: Destilação por arraste a vapor.

O vapor de água ao passar pelo material vegetal vai arrastar os óleos consigo, sendo depois arrefecido pela água fria e condensando-se, resultando numa misturade de óleos essenciais e hidrolato.

Após a extração e pesagem, foram calculados os rendimentos dos óleos obtidos, usando a seguinte equação.

$$Rendimento\ = (m_{óleo})/(m_{planta}) \times 100$$

Equação 1 – Fórmula de cálculo do Rendimento ($m -$ massa)

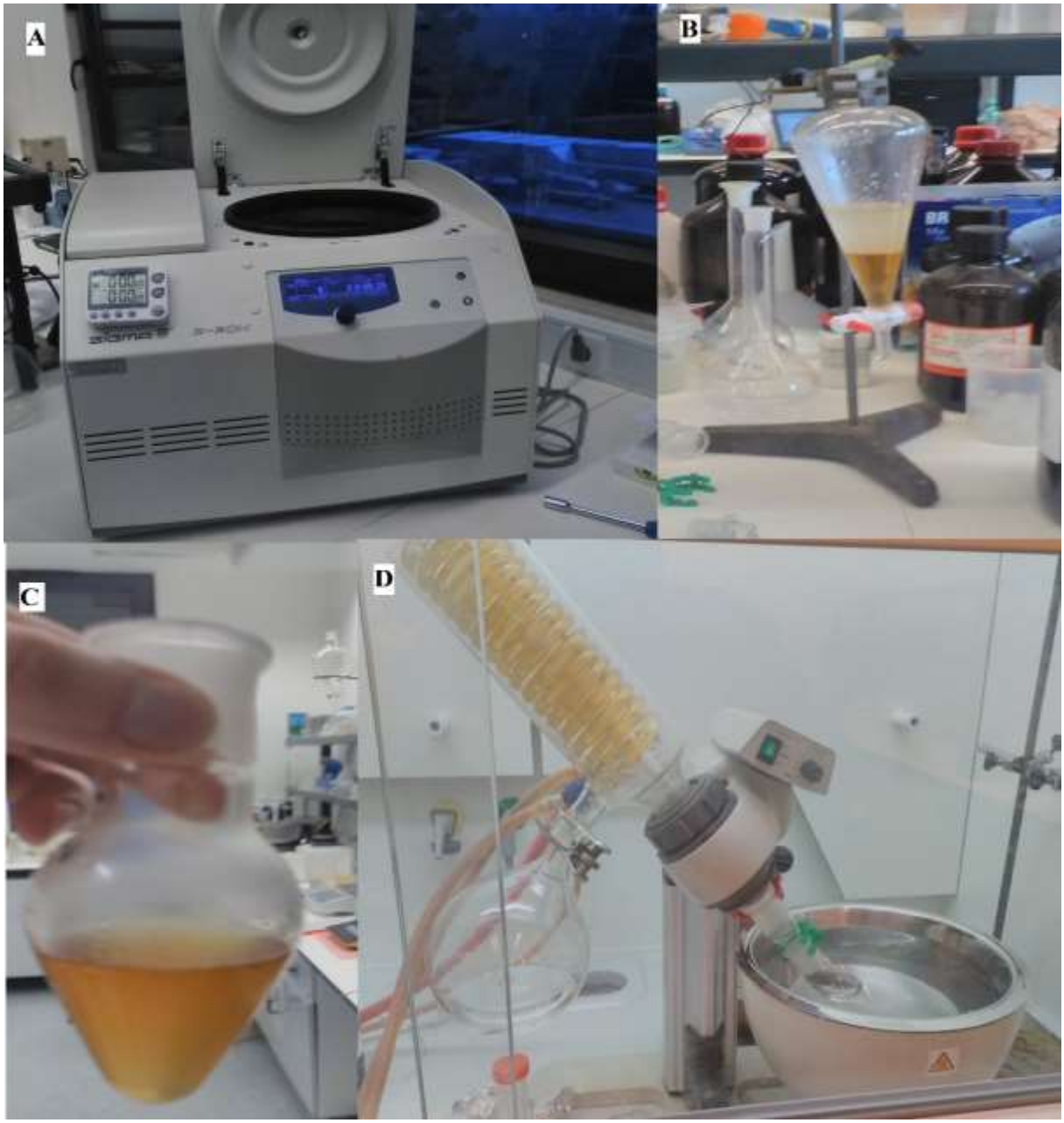


Figura 9: Separação do óleo da fase aquosa.

A-Centrifugadora; B-Funil de separação havendo a separação do óleo; C-óleo e clorofórmio no balão em pera; D-Evaporador Rotativo à Vácuo.

3.4. Análise da composição do óleo essencial

Para análise dos constituíntes do óleo essencial dos tomilhos foram utilizados 1 mg de óleo essencial de cada tomilho e 2 mL de clorofórmio. A análise destas amostras foi realizada mediante cromatografia em fase gasosa acoplada à espetrometria de massa (GC-MS) (Figura 10).

3.4.1. Cromatografia em fase gasosa acoplada à espetrometria de massa

Foi utilizada uma coluna capilar FFAP, 30 m, 0,32 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura.

Foi injetado 1 μL, à temperatura de 260 ºC, em modo *splitless* (tempo *splitless* 1 min). A temperatura inicial da coluna foi mantida a 40 ºC durante 4 minutos sendo posteriormente aumentada até 220 ºC, à velocidade de 2,5 ºC/min e aumentada novamente até a temperatura final de 280 ºC, à velocidade de 10ºC/min, onde se manteve durante 5 minutos. O gás de arraste utilizado foi o hélio, que foi mantido a fluxo constante, de 1,0 mL/min.

O espetro de massa foi adquirido em full scan (30-800 m/z), EI 70 eV, com uma temperatura da fonte de ionização de 220 ºC.

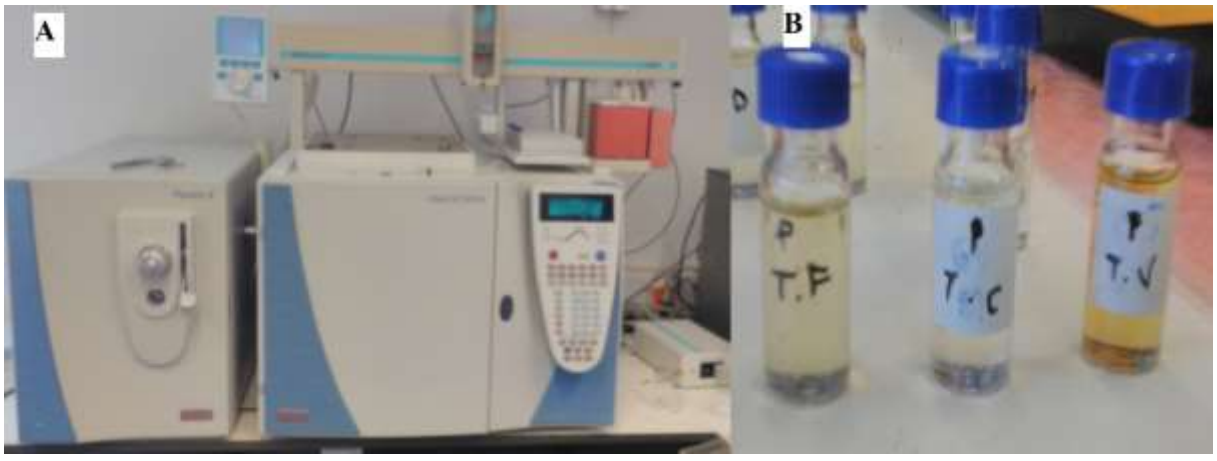


Figura 10: Cromatografia gasosa acoplada à espetrometria de massa (GC-MS).
A-Cromatógrafo acoplado a um espectrómetro de massa; B-amostras prontas para a análise (óleos + clorofórmio).

Foram calculadas as percentagens de cada composto e o respetivo Índice de Kovats **(Equação 2).**

$$\mathrm{RI} = 100\mathrm{n} + 100\frac{\mathrm{Tr(i)} - \mathrm{Tr(n)}}{\mathrm{Tr(n+1)} - \mathrm{Tr(n)}}$$

Tr– tempo de retenção;

i – analito;

n – número de carbonos do padrão adjacente menos retido;

n + 1 –número de carbonos do padrão adjacente mais retido.

Equação 2: Índice de Kovats ou índice de retenção (RI). (von Mühlen, 2009)

3.5. Cultura de células animais

3.5.1. Manutenção e manuseamento

A linha celular utilizada neste trabalho foi a Raw 264.7 (linha celular de macrófagos, American Type Culture Colection). As células foram mantidas em meio de cultura completo numa incubadora (Binder) a 37 °C com 5 % CO_2/ 95% ar.

As linhas celulares foram sempre manipuladas em condições assépticas numa câmara de fluxo laminar, classe I (Faster, BH–EN 2004) para prevenir uma possível contaminação celular.

3.5.2. Meios de Cultura e soluções

O meio de cultura é um dos fatores mais importantes na cultura de células e na cultura de tecidos, devendo este fornecer todos os nutrientes essenciais para o metabolismo, crescimento e proliferação celular. Este é constituído por vitaminas, aminoácidos, glucose e iões inorgânicos entre outros. O meio foi sempre mantido no frigorífico, a 4ºC.

Todos os processos realizados foram feitos com os devidos cuidados, de modo a evitar contaminação.

3.5.2.1. Meio de cultura sem soro

O meio de cultura é constituído pelo meio base DMEM (Dulbeco`s Modified Eagles Medium, Gibco), suplementado com 2 mM de L-glutamina (Gibco, Life technologies), e antibióticos (200 U/mL Penicilina e 200 μg/mL Estreptomicina), (Gibco, Life technologies). Este meio base já contém 25 mM de glucose e 0,1 g/L de piruvato (Andreani et al., 2014).

3.5.2.2. Soluções *stock*

As amostras selecionadas para avaliação dos seus efeitos nas células em cultura, foram pesadas e diluídas em DMSO de forma a obter uma concentração de 40 mg/mL (solução *stock*). Destas foram posteriormente obtidas as soluções, com as concentrações finais a testar, por diluição da solução *stock* em meio de cultura sem soro.

3.5.3. Manutenção da linha celular

Neste trabalho, utilizamos um meio de cultura que possui na sua composição vermelho de fenol (indicador de pH), à medida que este meio acidifica vai perdendo o tom avermelhado e passa a amarelado, isto indica que o meio já está gasto e pobre em nutrientes. Quando isto ocorre e se as células ainda não atingiram uma confluência de 80-90 % então faz-se a mudança do meio de cultura sem tratamento com tripsina (passagem ou subcultura). Sempre que se muda apenas o meio, retiram-se os frascos de cultura da incubadora e com uma pipeta remove-se o meio de cultura. Depois adiciona-se cerca de 5 mL de meio de cultura completo (a frascos de T25) e recoloca-se o frasco de cultura na incubadora a 37 °C com 5 % CO_2 (Martins-Gomes et al., 2018).

3.5.4. Subcultura das células

Células a crescer em frasco de 25 cm^2 de área de adesão (T25; Orange Scientific), são submetidas a subcultura todas as semanas. Inicialmente, foi retirado o meio onde estas se encontravam, tendo o cuidado de não tocar com a pipeta de Pasteur em nenhum lado para

garantir a esterilidade. De seguida, fez-se a primeira lavagem com 1 mL de HBSS (*Hanks balanced salt solution*) para remover vestígios de soro e cálcio. Após a lavagem, retira-se este meio e coloca-se 5 mL de meio de cultura DMEM ao frasco, e recoloca-se a cultura na incubadora a 37 °C e 5 % de CO_2 (Silva, 2014).

3.5.5. Contagem de células

Após a subcultura, e com as células individualizadas, procedeu-se à contagem das células. O número de células foi determinado através da utilização de um contador automático (TC10 automated cell counter; BIO-RAD, Portugal) onde foi colocada uma alíquota de suspensão de células numa lâmina de leitura (BIO-RAD, Portugal) e realizou-se a contagem de células. Após determinado o número de células por mililitro de suspensão são realizados cálculos de forma a realizar as diluições para $5x10^4$ células/ mL.

3.6. Avaliação da citotoxicidade

Para testarmos o efeito dos vários extratos na viabilidade celular das células Raw 264.7, estas foram sujeitas a subcultura e plantadas em placas de cultura de 96 poços à densidade de $5x10^4$ células/ mL (100 µL/poço) e foram deixadas a estabilizar (para adesão às placas de cultura) durante pelo menos 24 h.

Foram feitos dois ensaios diferentes, um 1.º com concentrações de 1, 25, 50, 100 e 200 µg/mL e o 2.º com concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50 µg/mL, as quais foram preparadas, realizando diluições das soluções *stock* dos óleos (40 mg/mL) em meio de cultura sem soro.

Retirou-se o meio de cultura das células em cada poço, adicionou-se 100 µL das soluções teste preparadas anteriormente. As células foram expostas aos extratos por períodos de 24 e 48 h. No fim de cada tempo de exposição, o meio de cultura com o extrato foi removido, e foram adicionados 100 µL de solução de *Alamar blue* (AB) (*Invitrogen, Alfagene, Portugal*) diluída em meio de cultura sem soro (10% v/v). Após 4 a 5 h, após a adição do AB, foi medida a absorbância, a 570 e 620 nm no espetrofotómetro de microplacas (*Labsystems original Multiskan EX*). Foram realizados ensaios em quadruplicados, tal como descrito anteriormente (Andreani et al., 2014; Martins-Gomes et al., 2018).

Os resultados foram analisados em termos do cálculo da % de redução do AB, segundo a expressão:

$$\%\ \text{de redução de AB} = \frac{(\varepsilon_{ox}\,\lambda_2)(A\,\lambda_1) - (\varepsilon_{ox}\,\lambda_1)(A\,\lambda_2)}{(\varepsilon_{red}\,\lambda 1)(A'\,\lambda 2) - (\varepsilon_{red}\,\lambda 2)(A'\,\lambda 1)} \times 100$$

Equação 3 – Fórmula de cálculo da percentagem da redução de Alamar blue. (adaptado de Al-Nasiry et al., 2007)

Na fórmula ελ1 e ελ2 representa o coeficiente de extinção molar de AB a 570 e 620 nm, respetivamente, no estado oxidado (ε ox) e reduzido (ε red). Aλ1 e Aλ2 representam a absorbância da amostra a 570 e 620 nm, respetivamente. A'λ1 e A'λ2representam a média da absorbância do controlo a 570 e 620 nm, respetivamente.

3.7. Atividade anti-inflamatória

Para testarmos o efeito dos vários extratos na atividade anti-inflamatória das células Raw 264.7, estas foram sujeitas a subcultura e plantadas em placas de cultura de 96 poços à densidade de $5x10^4$ células/ mL (100 µL/poço) e foram deixadas a estabilizar (para adesão às placas de cultura) durante pelo menos 24h.

Primeiro foi feita uma nova solução *stock* de óleos (1mg/mL), diluindo 10 µL das soluções stock (40 mg/mL) já feitas em 390 µL de H_2O.

Foi feito um ensaio com concentrações de 1, 5 e 10 µg/mL, as quais foram preparadas realizando diluições das soluções *stock* dos óleos (1 mg/mL) em meio de cultura sem soro e em solução 1 µg/mL LPS (6 ml meio base + 6 µL de LPS solução stock 1 mg/ml).

Retirou-se o meio de cultura das células em cada poço, adicionou-se 100 µL das soluções teste preparadas anteriormente.

Após as 24 h, 50 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 4ºC, em que o reagente A é preparado com sulfanilamida a 1 % (m/v) em H_3PO_4 a 5% (v/v) em H2O mili-Q e o reagente B com *N*-(1-naftil)-etilenodiamina a 0,1 % (m/v) em H_2O mili-Q)] numa microplaca de 96 poços. A placa foi mantida ao abrigo da luz durante 10 minutos à temperatura ambiente. A absorbância foi lida a 540 nm no espetrofotómetro de microplacas (*Labsystems original Multiskan EX*) (figura 11). Foram realizados ensaios em quadruplicados (Martins-Gomes et al., 2018).

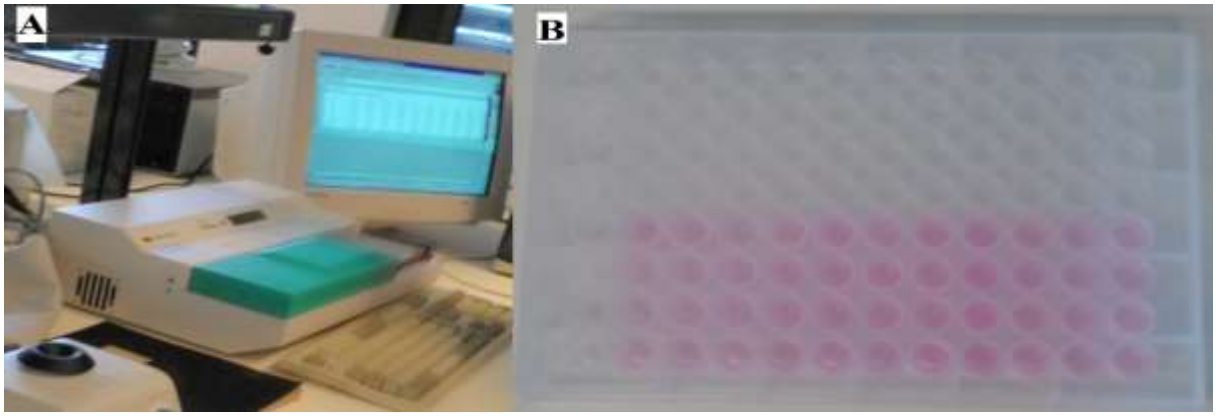


Figura 11: Leitura absorbância.

A-Espetrofotómetro; B-Microplaca utilizada na reação de Griess.

Os resultados foram analisados em termos do cálculo da Inibição da produção de NO, segundo a expressão:

$$Inhibition\ (\%) = \frac{Control - Test}{Control} \times 100$$

Equação 4: Fórmula de cálculo da percentagem da Inibição da produção de NO. (adaptado de Rao et al., 2016)

3.8. Análise dos dados

Todos os resultados são expressos como média ± desvio-padrão (S.D.), tendo sido utilizado o *software* Microsoft ® Excel 2016.

As análises estatísticas foram aplicadas usando o programa GraphPadPrism, versão 7 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

4. Resultados e discussão

4.1. Desinfeção e estabelecimento dos explantes *in vitro*

A cultura *in vitro* de células vegetais é uma técnica que nos permite obter uma multiplicação e crescimento de plantas geneticamente iguais durante todo o ano, sobre condições controladas. Permitindo-nos colher plantas com as mesmas características genéticas e extrair óleos essenciais com a sua composição mais controlada em qualquer altura do ano. Esta técnica também nos permite, através da manipulação de varios factores como; temperatura, humidade, exposição à luz, idade e desenvolvimento das plantas, utilização de elicitadores e nutrientes fornecidos, produzir um maior rendimento dos óleos e tentar manipular a sua composição. Estes factos levaram a que se tentasse obter material vegetal *in vitro* que permitisse avaliar a composição e bioatividade de óleos essenciais de *Thymus*.

Relativamente aos resultados do processo de desinfeção, na primeira metodologia seguida em que se avaliou a influência do fungicida na desinfeção dos explantes, não se observaram diferenças consistentes entre o uso ou não deste relativamente ao número de explantes vivos (Tabela 6). No entanto observou-se um maior número de explantes queimados e secos devido ao uso de fungicida.

No segundo processo de desinfeção, variou-se o tempo (30 e 45 minutos) e a concentração de lixivia (2:3 ou 3:2 partes de água para partes de lixívia). Nas primeiras semanas ambas as desinfeções mais agressivas (2:3 45 minutos e 3:2 30 minutos), apresentavam resultados semelhantes, estando apenas os explantes da segunda um pouco mais secos. No entanto, nas últimas semanas observamos que a desinfeção com melhores resultados foi a de 2:3 45minutos, provavelmente por ser menos agressiva para os explantes (Tabela 6).

O *Thymus fragrantissimus* foi o que apresentou os piores resultados, apresentando em ambos os processos de desinfeção 100% de contaminações, logo na 1º semana (Tabela 6). As contaminações apresentadas foram infeções fungícas que cobriam todo o explante.

Os melhores resultados obtidos foram com o segundo processo, 2:3 45 minutos, obtendo-se 28,5% de sobrevivência do *Thymus x citriodorus* e 9,5% do *Thymus vulgaris.* No terceiro processo de desinfeção apenas foi utilizado *Thymus vulgaris*, obtendo-se uma percentagem de sobrevivência semelhante, 9,8%. No entanto, estes resultados dizem respeito

apenas até à quarta semana de cultura, pois a maior parte dos explantes acabaram por secar ou foram afetados por contaminação mais tardias. No final deste estudo ficaram apenas 5 explantes de *Thymus vulgaris* e 1 explante de *Thymus x citriodorus.* A baixa quantidade de material obtida, no decorrer deste estudo, não permitiu fazer uma análise dos óleos, partindo de material obtido *in vitro*.

Tabela 6: Número de explantes das diferentes espécies de *thymus* para os diferentes tipos de desinfeção

Desinfeção			Nº exp. inicial	Semana			
				1ª	2ª	3ª	4ª
1ª	Lixívia 2:3 30 minutos	T.C.	30 exp.	12 exp.	6 exp.	0 exp.	0 exp.
		T.F.	42 exp.	0 exp.	0 exp.	0 exp.	0 exp.
		T.V.	30 exp.	24 exp.	3 exp.	1 exp.	1 exp.
	Lixívia 2:3 30 minutos + Fungicida 6g/L 30 minutos	T.C.	30 exp.	15 exp.	3 exp.	0 exp.	0 exp.
		T.V.	30 exp.	12 exp.	9 exp.	1 exp.	1 exp.
2ª	Lixívia 2:3 30 minutos	T.C.	21 exp.	6 exp.	3 exp.	1 exp.	1 exp.
		T.V.	21 exp.	7 exp.	6 exp.	0 exp.	0 exp.
	Lixívia 2:3 45 minutos	T.C.	21 exp.	15 exp.	10 exp.	6 exp.	6 exp.
		T.F.	66 exp.	0 exp.	0 exp.	0 exp.	0 exp.
		T.V.	21 exp.	10 exp.	6 exp.	2 exp.	2 exp.
	Lixívia 3:2 30 minutos	T.C.	21 exp.	9 exp.	6 exp.	1 exp.	1 exp.
		T.V.	21 exp.	14 exp.	12 exp.	0 exp.	0 exp.
3ª	Lixívia 2:3 45 minutos	T.V.	51 exp.	27 exp.	10 exp.	5 exp.	5 exp.

Numero de explantes (exp) vivos durante as 4 semanas seguintes das varias desinfeções, do *Thymus x citriodorus* (T.C.), *Thymus fragrantissimus* (T.F.) e *Thymus vulgaris* (T.V.)

A obtenção de culturas em assepsia é o primeiro passo para o sucesso da micropropagação. Nesta etapa, como em outros trabalhos do género *Thymus*, os quais obtiveram apenas 8% de sucesso, (Mendes et al., 2012; Mendes, 2014), houve uma grande incidência de contaminações conduzindo a uma baixa percentagem de estabelecimento dos explantes em cultura. Dito isto, esta baixa percentagem não é inteiramente um problema, pois na cultura *in vitro* mesmo que se consiga só estabelecer uma planta, consegue-se multiplicá-la obtendo um elevado nº de plantas. O que, contudo, não foi possível neste estudo em tempo útil para apresentar aqui outros resultados.

Alguns dos motivos que podem ter tornado o processo de desinfeção mais difícil, foram, o facto de o *Thymus* ter muitas folhas pequenas e juntas, dificultando a eliminação de todos os contaminantes, e o facto de que algumas amostras já se encontrarem um pouco secas, sendo estas mais sensíveis á descontaminação.

4.2. Rendimento da extração dos óleos essenciais

Os rendimentos obtidos aparentam ser baixos relativamente aos de outros estudos referidos anteriormente (Tabela 7), no entanto devemos ter em atenção que na maioria desses estudos, os rendimentos foram calculados a partir de massa seca e muitas vezes só usando as folhas, enquanto neste trabalho foi usada toda a planta (Horváth et al. 2006; Jakiemiu, 2008; Jakiemiu et al., 2010;Mancini et al., 2015; Nezhadali et al., 2014; Omidbaigi et al.,2009; Silva, 2014).

Outros fatores que têm influência no rendimento do óleo essencial são: o método de extração usado, estação do ano da recolha, idade e desenvolvimento da planta, humidade, tipo de solo, temperatura, erradiação luminosa do local de colheita, partes usadas e tipo de extração (Borsato et al., 2008; Steffens, 2010).

Tabela 7: Massa e rendimento do óleo essencial obtidos da amostra inicial.

Planta	Peso planta (g)	Peso do óleo (g)	Rendimento (%)
T.C.	509,4	0,11	0,0216
T.F	384,2	0,38	0,0989
T.V	402	0,23	0,057

Abreviaturas: *Thymus x citriodorus* (T.C.), *Thymus fragrantissimus* (T.F.) e *Thymus vulgaris* (T.V.)

4.3. Composição dos óleos essenciais

Os diferentes constituintes foram separados e quantificados por GC-MS. Obtidos os cromotogramas (Figura 12) e os espectros de massa (anexo 7.3) dos respectivos picos, foi possível determinar a composição dos óleos essenciais comparando o Índice de Kovats e os espetros de massa com os da base de dados NIST e bibliografia. A composição qualitativa e quantitativa dos óleos essenciais é apresentada na tabela 8, onde os componentes estão

listados de acordo com a sua eluição na coluna polar. Os compostos estao representados nos cromotogramas como números.

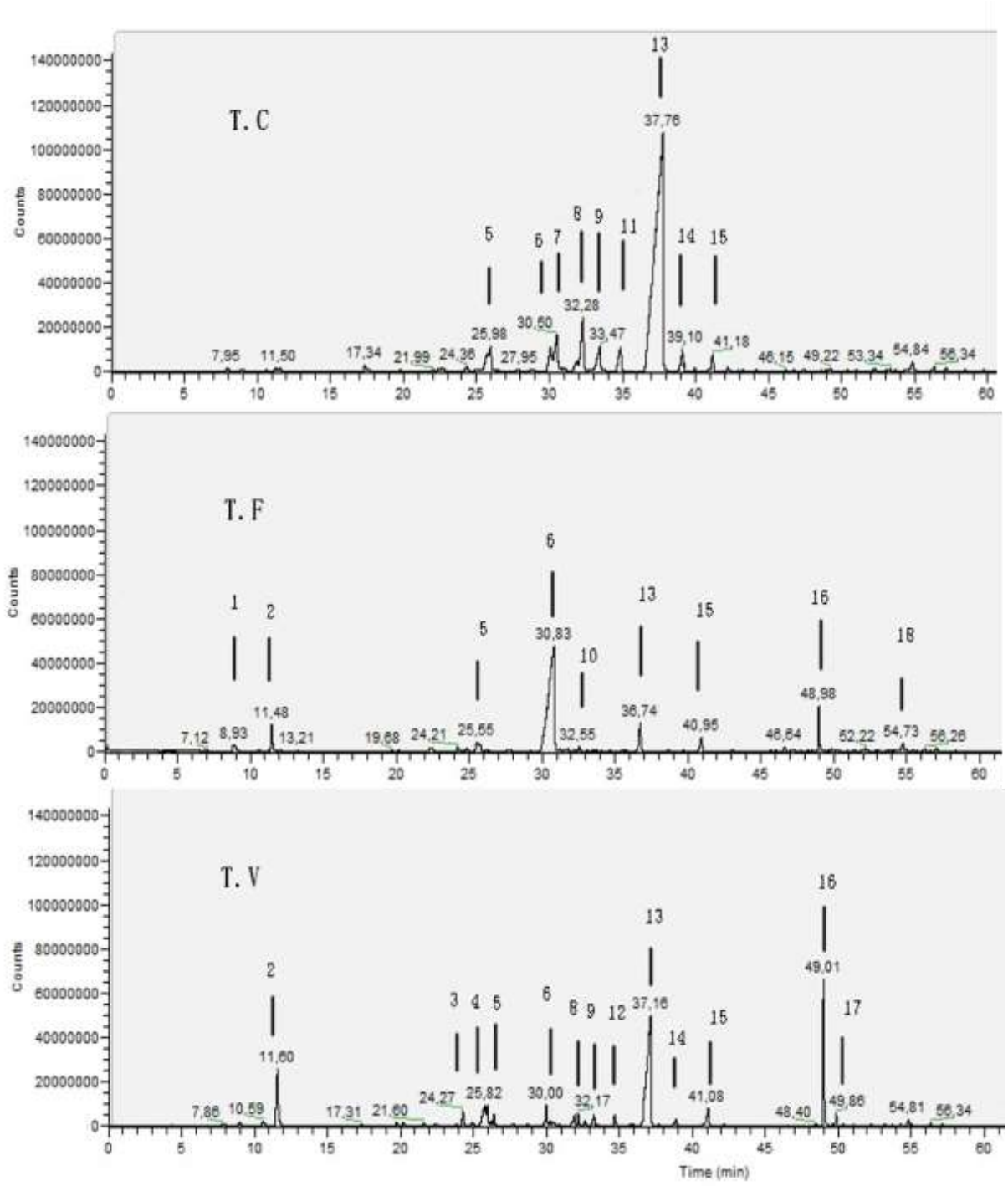


Figura 12: cromotogramas: *Thymus x citriodorus* (T.C.), *Thymus fragrantissimus* (T.F.) e *Thymus vulgaris* (T.V.). Lista dos compostos segundo os números na tabela 8.

Tabela 8: composição dos óleos

Numero	RI	Nome	T.C	T.F.	T.V.
1	1148	β-Pineno	---	2,20%	---
2	1230	*p*-Cymeno	---	4,48%	10,01%
3	1560	Acetato de linalila	---	---	2,05%
4	1600	Timol metil éter	---	--	8,94%
5	1615	Aromadendreno	3,48%	3,65%	1,33%
6	1705	Borneol	2,69%	69,30%	2,92%
7	1710	α-terpineol	4,16%	---	---
8	1756	Valenceno	6,12%	---	2,63%
9	1774	Butirato de citronelulose	2,69%		1,79%
10	1780	Delta cadineno	---	1,27%	---
11	1816	Nerol	1,93%	---	---
12	1861	Acetato de timol	---	---	1,63%
13	1879	Geraniol	72,85%	5,07%	41,20%
14	1920	Butirato de geranilo	1,91%	---	1,31%
15	1993	Óxido de cariofileno	1,31%	3,57%	3,48%
16	2193	Timol	---	5,36%	15,68%
17	2219	Carvacrol	---	---	1,26%
18	2435	α-Kaureno	---	1,56%	---

RI-Índice de Kovats ou índice de retenção. T.C (*Thymus x citriodorus)*,T.F. (*Thymus fragrantissimus)* e T.V. (*Thymus vulgaris);* --- (Não detectado).

O geraniol (72,85%) foi o composto maioritário no *Thymus x citriodorus*, sendo este considerado o principal composto da espécie, tal como vimos anteriormente, podendo também observar-se outros compostos principais presentes no entanto com baixa percentagem como o nerol (1,93%), borneol (2,69%) e o α-terpineol (4,16%) (Tabela 8).

Vários fatores podem influenciar a percentagem dos compostos, tais como o método de extração usado, estação do ano da recolha e local da recolha.

No *Thymus fragrantissimus*, o principal composto encontrado foi o borneol (69,30%), seguido por alguns compostos comuns do género *Thymus*, como geraniol (5,07%), timol (5,36%) e p-cimeno (4,48%).

Contrariamente ao quimiotipo mais comum do *Thymus vulgaris*, o composto maioritário foi o geraniol (41,20%), seguido pelo timol (15,68%) e pelo *p*-cimeno (10,01%) os quais são, como já visto na Tabela 4, os compostos maioritários do quimiotipo mais comum nesta espécie, estando presente também o carvacrol (1,26%), no entanto com

percentagem reduzida. Observa-se também a existência de compostos derivados do timol como o timol metil éter (8,94%) e o acetato de timol (1,63%).

4.4. Avaliação da citotoxicidade

Neste trabalho pretendeu-se estudar o efeito da aplicação dos vários extratos das três espécies de tomilho, na viabilidade e crescimento celular da linha celular em cultura, nomeadamente as células Raw 264.7. Para tal fizemos dois ensaios diferentes, um 1.º com concentrações de 1, 25, 50, 100 e 200 µg/mL (Figura 13) e o 2.º com concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50 µg/mL, com tempo de exposição de 24 e 48 h (Figura 14).

O objetivo deste procedimento é observar, através da percentagem de redução de Alamar blue, se as células são viáveis e se o seu crescimento foi contínuo.

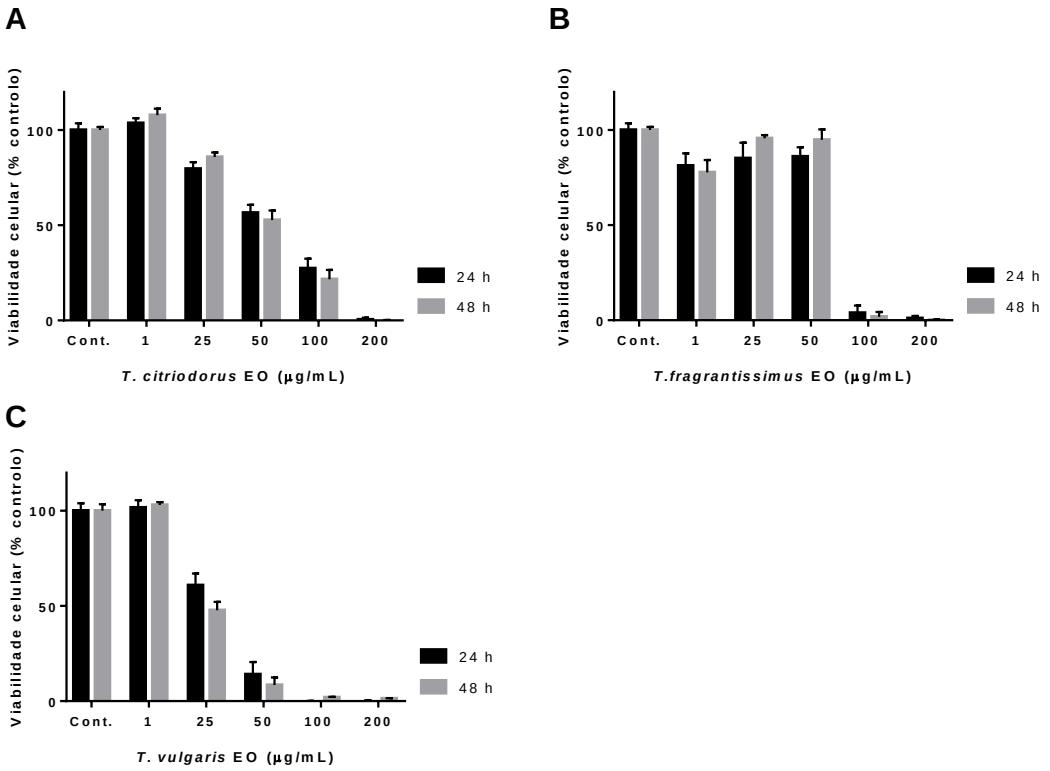


Figura 13: 1º ensaio de viabilidade celular (em percentagem de redução de Alamar blue) em células Raw 264.7 expostas aos extratos das três espécies de tomilho. A-*Thymus x citriodorus;* B-*Thymus fragrantissimus*; C-*Thymus vulgaris;* Os gráficos referem a % de redução do A*lamar blue* após exposição das células aos compostos, nas concentrações de 1, 25, 50, 100 e 200 µg/mL durante 24 e 48 horas.

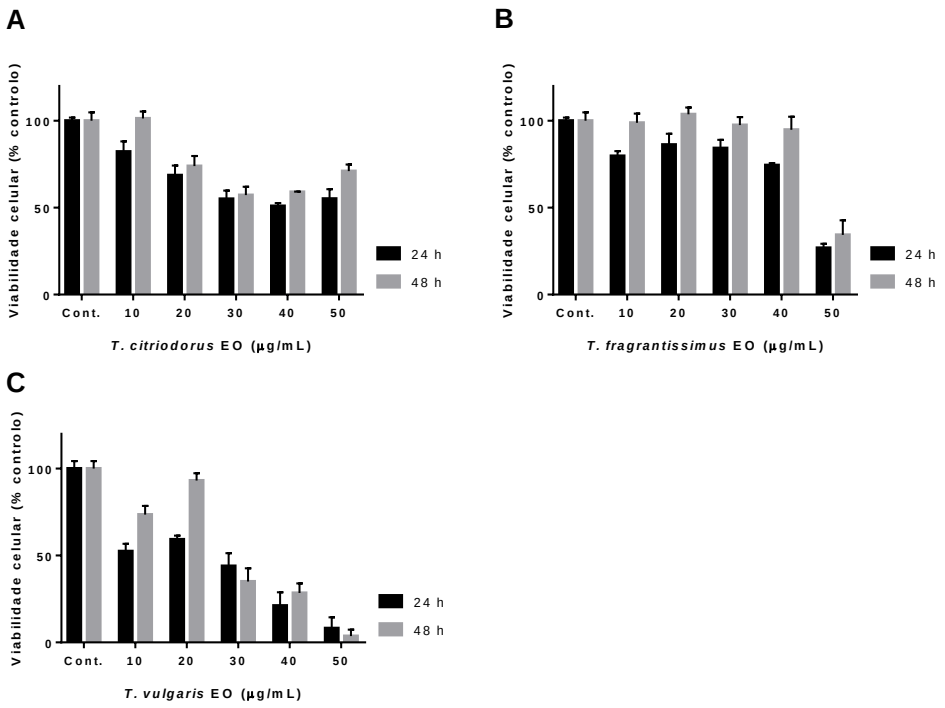


Figura 14: 2º ensaio de viabilidade celular (em percentagem de redução de Alamar blue) em células Raw 264.7 expostas aos extratos das três espécies de tomilho. A-*Thymus x citriodorus;* B-*Thymus fragrantissimus*; C-*Thymus vulgaris;* Os gráficos referem a % de redução do *Alamar blue* após exposição das células aos compostos, nas concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50 µg/mL durante 24 e 48 horas.

No geral quando houve diminuição da percentagem de redução de Alamar blue em relação ao controlo poderá ter ocorrido uma inibição do crescimento celular devido a uma alteração na regulação do ciclo celular das células. Por outro lado, estes compostos poderiam ter provocado morte celular, não havendo desta forma, estruturas celulares para que ocorra a redução da resazurina. Quando os compostos provocam o aumento da percentagem de redução de Alamar blue poderá ter ocorrido um indução no crescimento celular. Pode ser observado também em ambas as Figura 13 e 14 mas mais na Figura 14, uma inicial diminuição da viabilidade celular (24 h) seguida de um aumento da mesma (48 h), podendo isto ser explicado pelo facto destes compostos, inicialmente terem provocado um efeito supressor na viabilidade celular, tendo sido depois degradados por enzimas ecto-plasmáticas e originar compostos sem efeito ou até compostos que promovam o crescimento celular e/ou também o facto de os compostos serem voláteis e deixarem de atuar nas células permitindo o seu crescimento.

Podemos observar de imediato na Figura 13, uma grande descida da viabilidade celular a partir 50 μg/mL, 25 μg/mL no caso *Thymus vulgaris* e também que os extratos de *Thymus fragrantissimus* são os que aparentam ter menor citotoxicidade.

Observa-se também em ambos os ensaios no *Thymus fragrantissimus* uma descida na viabilidade celular, para concentrações entre os 50 e os 100 μg/mL (Figura 13 e 14). Esta descida repentina de viabilidade, pode ter acontecido por interação dos óleos essenciais com as membranas celulares das células ou pelo facto de os componentes dos óleos de algum modo ativarem vias de morte celular, situação que seria interessante de explorar no futuro.

Na Figura 14 podemos observar mais pormenorizadamente as situações referidas no caso da Figura 13. Observando-se que o *Thymus vulgaris* é o que apresenta maior citotoxicidade, apresentando logo nos 10 μg/mL apenas 52% nas 24 h, no entanto a 30 μg/mL observa-se alguma recuperação da viabilidade nas 48 h podendo significar que, nestas concentrações há sinergismos entre compostos com ações distintas nas células, uns que induzem a morte celular outros que as protegem.

No caso do *Thymus x citriodorus* só a partir dos 30 μg/mL se observa uma perda de viabilidade, para valores à volta dos 55%, a qual se mantém até 50 μg/mL continuando mesmo nesta concentração a haver alguma recuperação da viabilidade celular (48 h).

O *Thymus fragrantissimus* mantem a viabilidade celular acima dos 75% até 50 μg/mL, na qual observamos uma descida repentina para os 26% do controlo.

A razão para o óleo essencial de *Thymus vulgaris* se apresentar mais citotóxico pode ser pelo facto da presença dos compostos carvacrol, *p*-cimeno e timol os quais possuem alguma toxicidade já documentada (Rodrigues, 2014; Sobral et al., 2014).

4.5. Atividade anti-inflamatória

Nesta fase pretendeu-se estudar o efeito da aplicação dos vários extratos (óleos essenciais) das três espécies de tomilho, na atividade anti-inflamatória, avaliada pela inibição da produção de óxido nítrico (NO) na linha celular Raw 264.7 em cultura. Para tal, fez-se um ensaio com concentrações de 1, 5 e 10 μg/mL, sendo estas as que ~~apresentavam~~ produziram maior viabilidade celular, com tempo de exposição de 24 h (figura 15).

O objetivo deste procedimento é observar, através da inibição da produção de NO, o efeito anti-inflamatório com os extratos sobre estas células induzidas com LPS, um estímulo natural para a síntese de NO.

No geral, na inibição da produção de NO, valores positivos representam uma atividade anti-inflamatória e valores negativos atividade pró-inflamatória. Sendo que no caso da atividade pró-infamatória ocorre pelo facto dos extratos promoverem direta ou indiretamente a produção de NO, no entanto no caso da anti-inflamatória pode ocorrer devido a inibição da produção de NO ou "*scavenging*" de NO.

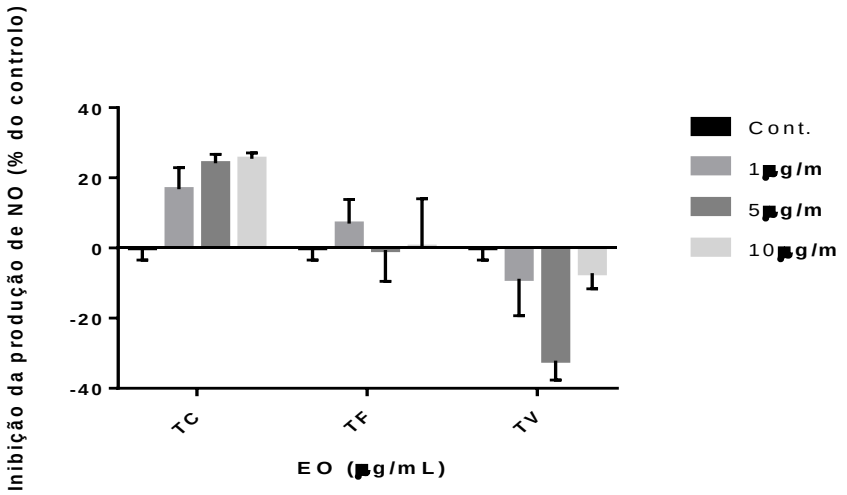


Figura 15: Inibição da produção de nitritos em macrófagos (Raw 264.7) expostas aos extratos das três espécies de tomilho. TC-*Thymus x citriodorus;* TF-*Thymus fragrantissimus*; TV-*Thymus vulgaris;* O gráfico refere-se a % da inibição da produção de nitritos relativamente ao controle, após exposição das células aos compostos, nas concentrações de 1, 5 e 10 μg/mL durante 24 horas; valores positivos representam uma atividade anti-inflamatória e valores negativos atividade pró-inflamatória.

Na Figura 15 podemos observar que o *Thymus x citriodorus* apresenta uma boa atividade anti-inflamatória a qual vai aumentando com a concentração, até aos 25%, sendo os extratos deste, os que apresentaram melhores resultados.

No caso do *Thymus fragrantissimus* podemos observar um pouco de atividade anti-inflamatória 7% ao 1 μg/mL.

No entanto no caso do *Thymus vulgaris* observámos atividade pró-infamatória que vai até aos 32% aos 5 μg/mL, ocorrendo uma descida aos 10 μg/mL para 7%. Esta descida da atividade pró-infamatória dos 32% para 7% pode ser devido à morte celular de algumas células, diminuindo assim a produção de NO, pois a concentração 10 μg/mL coincide com a concentração às 24h de exposição a que já só existia 52% de viabilidade celular.

A razão para o *Thymus x citriodorus* apresentar a melhor atividade anti-inflamatória, pode dever-se à sua concentração de Geraniol o qual tem a capacidade de inibir a produção de NO (Miguel, 2010; Sobral et al., 2014).

5. Conclusões Gerais

Relativamente à desinfeção e estabelecimento das explantes *in vitro,* a grande quantidade de contaminação e agressividade da descontaminação, tornam o estabelecimento *in vitro* das espécies em estudo muito difícil. A desinfeção que obteve melhores resultados foi a de 2 partes de lixivia para 3 partes de água, durante 45 minutos, apenas no caso do *Thymus x citriodorus* e do *Thymus vulgaris.*

Os rendimentos da extração dos óleos essenciais obtidos foram 0,0216% para o *Thymus x citriodorus,* 0,0989*%* para o *Thymus fragrantissimus* e 0,057% para o *Thymus vulgaris.*

Os compostos maioritários dos óleos essenciais foram o Geraniol (72,85%) no *Thymus x citriodorus*, o Borneol (69,30%) no *Thymus fragrantissimus* e o Geraniol (41,20%) no *Thymus vulgaris*, sendo que este ultimo não coincide com outros estudos, contendo, no entanto, Timol (15,68%) e p-Cimeno (10,01%), os quais são os mais comuns nessa espécie.

Relativamente à citotoxicidade observou-se que o *Thymus vulgaris* foi o que apresentou maior citotoxicidade devido à presença dos compostos Carvacrol, p-Cimeno e Timol os quais possuem alguma toxicidade. Relativamente ao *Thymus x citriodorus* e *Thymus Fragrantissimus* só a partir de 50 μg/mL é que apresentaram maior citotoxicidade. Podemos em alguns casos, usar a citotoxicidade dos óleos do *Thymus vulgaris* como tendo ação anti-proliferativa contra células cancerigenas.

A atividade anti-inflamatória foi realizada com concentrações de 1, 5 e 10μg/mL, pois estas eram as que apresentavam menor citotoxicidade. Observámos que *Thymus x citriodorus* era o que apresentava maior atividade anti-inflamatória e que o *Thymus vulgaris* apresentava atividade pró-inflamatória. Podemos em alguns casos, usar a atividade pró-inflamatória na sensibilizaçao do sistema imunitário.

Em conclusão os óleos essenciais de *Thymus x citriodorus* são os que têm maior potencial para uso anti-inflamatório, sendo estes também pouco citotóxicos. Podendo aproveitar-se esta bioactividade diretamente através de infusões da planta.

Continuam, no entanto, a ser necessários mais estudos, com diferentes concentrações e de diferentes quimiotipos das espécies de *Thymus*, e sobre a influência dos vários compostos e das intereções entre estes, nas várias bioatividades, para que possamos entender e aproveitar melhor as propriedades dos óleos essenciais das espécies de *Thymus*.

6. Bibliografia

Afonso, A. F., Pereira, O. R., Valega, M., Silva, A. M. S., & Cardoso, S. M. (2018). Metabolites and biological activities of *Thymus zygis*, *Thymus pulegioides*, and *Thymus fragrantissimus* grown under organic cultivation. *Molecules*, 23(7) 1514. doi:10.3390/molecules23071514

Andreani, T., Kiill, C. P., de Souza, A. L., Fangueiro, J. F., Fernandes, L., Doktorovova, S., Santos, D. L., Garcia, M. L., Gremião, M. P. D., Souto, E. B., Silva, A. M. (2014). Surface engineering of silica nanoparticles for oral insulin delivery: characterization and cell toxicity studies. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 123, 916-923. doi:10.1016/j.colsurfb.2014.10.047

Al-Asmari, A. K., Athar, M. T., Al-Faraidy, A. A., & Almuhaiza, M. S. (2017). Chemical composition of essential oil of *Thymus vulgaris* collected from Saudi Arabian market. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(2), 147-150.

Al-Nasiry, S., Geusens, N., Hanssens, M., Luyten, C., & Pijnenborg, R. (2007). The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. *Human Reproduction*, 22(5), 1304-1309.

Alves, M. P. (2013). Avaliação das potencialidades medicinais de *Thymus camphoratus* Hoffmanns. & Link. e *Thymus carnosus* Boiss. Dissertação de Mestrado. Coimbra, Portugal: Universidade de Coimbra.

Ambindei, W. A., Jazet, P. M. D., Tatsadjieu, L. N., Priya, P., Manilal, V., Krishnakumar, B., & Zollo, P. H. A. (2017). Effect of the essential oils of *Thymus vulgaris*, *Cinnamomum zeylanicum* and *Mentha piperita* on fungal growth and morphology. *African Journal of Biotechnology*, 16(9), 388-399.

Arikat, N. A., Jawad, F. M., Karam, N. S., & Shibli, R. A. (2004). Micropropagation and accumulation of essential oils in wild sage (*Salvia fruticosa* Mill.). *Scientia Horticulturae*, 100(1-4), 193-202. doi:10.1016/j.scienta.2003.07.006

Bandeira, J. M., Lima, C. S. M., Rubin, S., Ribeiro, M. V., Falqueto, A. R., Peters, J. A., & Braga, E. J. B. (2007). Diferentes tipos de vedações dos frascos e concentrações de sacarose na micropropagação de *Thymus vulgaris* L. *Revista Brasileira de Biociências*, 5(S2), 474-476.

Bayala, B., Bassole, I. H., Scifo, R., Gnoula, C., Morel, L., Lobaccaro, J.-M. A., & Simpore, J. (2014). Anticancer activity of essential oils and their chemical components-a review. *American journal of cancer research*, 4(6), 591-607.

Borsato, A. V., Doni-Filho, L., Côcco, L. C., & Paglia, E. C. (2008). Rendimento e composição química do óleo essencial da camomila [*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert] extraído por arraste de vapor d'água, em escala comercial. Semina: *Ciências Agrárias*, 29(1), 129-136.

Borugă, O., Jianu, C., Mişcă, C., Goleţ, I., Gruia, A., & Horhat, F. (2014). *Thymus vulgaris* essential oil: chemical composition and antimicrobial activity. *Journal of medicine and life*, 7(Spec Iss 3), 56-60.

Correia, M. R. M. C. (2014). Estudo da biotividade de óleos essenciais de tomilhos de Portugal. Dissertação de Mestrado. Coimbra, Portugal: Universidade de Coimbra.

Cruz, M. T., Duarte, C. B., Gonçalo, M., Figueiredo, A., Carvalho, A. 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), 590-596.

Dakah, A., Zaid, S., Suleiman, M., Abbas, S., & Wink, M. (2014). In vitro propagation of the medicinal plant *Ziziphora tenuior* L. and evaluation of its antioxidant activity. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 21(4), 317-323. doi:10.1016/j.sjbs.2013.12.002

Daneshvar-Royandezagh, S., Khawar, K., & Ozcan, S. (2009). In Vitro micropropagation of garden thyme (*Thymbra Spicata* L. Var. *Spicata* L.) collected from southeastern turkey using cotyledon node. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 23(3), 1319-1321.

Degani, A. L. G., Cass, Q. B., & Vieira, P. C. (1998). Cromatografia um breve ensaio. *Química nova na escola*, 7, 21-25.

Edris, A. E., Girgis, B. S., & Fadel, H. H. (2003). Recovery of volatile aroma components from aqueous waste streams using an activated carbon column. *Food Chemistry*, 82(2), 195-202.

El-Nekeety, A. A., Mohamed, S. R., Hathout, A. S., Hassan, N. S., Aly, S. E., & Abdel-Wahhab, M. A. (2011). Antioxidant properties of *Thymus vulgaris* oil against aflatoxin-induce oxidative stress in male rats. *Toxicon*, 57(7-8), 984-991.

Figueiredo, A., Barroso, J., Pedro, L., Salgueiro, L., Miguel, M., & Faleiro, M. (2008). Portuguese *Thymbra* and *Thymus* species volatiles: chemical composition and biological activities. *Current Pharmaceutical Design*, 14(29), 3120-3140.

Figueiredo, A. C., Barroso, J., & Pedro, L. (2006). Plantas aromáticas e medicinais. Factores que afectam a produção. Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais, Curso Teórico-Prático, 1-18.

George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G. J. (2008). Plant propagation by tissue culture 3rd Edition. *Springer, Dordrecht*.

Goodner, K., Mahattanatawee, K., Plotto, A., Sotomayor, J., & Jordan, M. (2006). Aromatic profiles of *Thymus hyemalis* and Spanish *T. vulgaris* essential oils by GC–MS/GC–O. *Industrial Crops and Products*, 24(3), 264-268.

Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S., & Tannenbaum, S. R. (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [^{15}N] nitrate in biological fluids. *Analytical biochemistry*, 126(1), 131-138.

Guillén, M. D., & Manzanos, M. J. (1999). Smoke and liquid smoke. Study of an aqueous smoke flavouring from the aromatic plant *Thymus vulgaris* L. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(10), 1267-1274.

Hamid, R., Rotshteyn, Y., Rabadi, L., Parikh, R., & Bullock, P. (2004). Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. *Toxicol In Vitro*, 18(5), 703-710. doi:10.1016/j.tiv.2004.03.012

Hartley, J. W., Evans, L. H., Green, K. Y., Naghashfar, Z., Macias, A. R., Zerfas, P. M., & Ward, J. M. (2008). Expression of infectious murine leukemia viruses by RAW264.7 cells, a potential complication for studies with a widely used mouse macrophage cell line. *Retrovirology*, 5(1), 1-6. doi:10.1186/1742-4690-5-1

Horváth, G., Szabó, L. G., Héthelyi, É., & Lemberkovics, É. (2006). Essential oil composition of three cultivated *Thymus* chemotypes from Hungary. *Journal of Essential Oil Research*, 18(3), 315-317.

Hudaib, M., Speroni, E., Di Pietra, A. M., & Cavrini, V. (2002). GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 29(4), 691-700.

Hussain, A. I., Anwar, F., Nigam, P. S., Sarker, S. D., Moore, J. E., Rao, J. R., & Mazumdar, A. (2011). Antibacterial activity of some Lamiaceae essential oils using resazurin as an indicator of cell growth. *LWT-Food Science and Technology*, 44(4), 1199-1206.

Jakiemiu, E. A. R. (2008). Uma contribuição ao estudo do óleo essencial e do extrato de tomilho (*Thymus vulgaris* L.). Pós-graduação. Brasil: Universidade Federal do Paraná.

Jakiemiu, E. A. R., de Paula Scheer, A., de Oliveira, J. S., Côcco, L. C., Yamamoto, C. I., & Deschamps, C. (2010). Study of composition and yield of *Thymus vulgaris* L. oil essential. Semina: *Ciências Agrárias,* 31(3), 683-688.

Jardim Botânico UTAD: jb.utad.pt (3 de Agosto de 2018)

Jelitto Perennial Seeds: www.jelitto.com/Seed/THYMUS+fragrantissimus+Portion+s.html (3 de Agosto de 2018)

Lanças, F. M. &McNair, H. M. (1983). Cromatografia em fase gasosa. 1. Teoria Elementar. *Quimica Nova* 6(1): 6-13.

Leal, F., Taghouti, M., Nunes, F., Silva, A., Coelho, A. C., & Matos, M. (2017). *Thymus* Plants: A Review—Micropropagation, Molecular and Antifungal Activity. *InTech*, 7, 107-125. doi:10.5772/66623

Mancini, E., Senatore, F., Del Monte, D., De Martino, L., Grulova, D., Scognamiglio, M., Snoussi, M., De Feo, V. (2015). Studies on chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of five *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Molecules,* 20(7), 12016-12028.

Martins, C. d. M. (2012). Estudo químico, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana e análise do óleo essencial da espécie *kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc (pau-santo) do cerrado. Dissertação de Mestrado. Brasil: Universidade Federal de Uberlândia.

Martins-Gomes, C., Taghouti, M., Schäfer, J., Bunzel, M., Silva, A. M., & Nunes, F. M. (2018). Chemical characterization and bioactive properties of decoctions and hydroethanolic extracts of *Thymus carnosus* Boiss. *Journal of Functional Foods,* 43, 154-164. doi:10.1016/j.jff.2018.02.012

McGarvey, D. J., & Croteau, R. (1995). Terpenoid metabolism. *Plant Cell*, 7(7), 1015-1026. doi:10.1105/tpc.7.7.1015

Mendes, M. D., Cristina Figueiredo, A., Margarida Oliveira, M., & Trindade, H. (2012). Essential oil production in shoot cultures versus field-grown plants of *Thymus caespititius*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC),* 113(2), 341-351. doi:10.1007/s11240-012-0276-9

Mendes, M. D. d. S. (2014). Molecular and biotechnological approaches to essential oils production in *Thymus caespititius*. Dissertação de Doutoramento. Lisboa, Portugal: Universidade de Lisboa

Mericko, P., Helmirch, A., Chen, L., Kusamoto, K., Toumadje, A., Chapline, C., Sato, D., Barnes, D. W. (2001). Cell Culture: Basic Procedures. *John Wiley & Sons, Ltd*.

Miguel, M. G. (2010). Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. *Molecules*, 15(12), 9252-9287.

Murashige, and Skoog.(1962). Duchefa Biochemie: https://www.duchefa-biochemie.com/product/details/number/M0222/name/murashige-skoog-medium-including-vitamins (7 de setembro de 2018)

Nezhadali, A., Nabavi, M., Rajabian, M., Akbarpour, M., Pourali, P., & Amini, F. (2014). Chemical variation of leaf essential oil at different stages of plant growth and in vitro antibacterial activity of *Thymus vulgaris* Lamiaceae, from Iran. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 3(2), 87-92.

Nikolić, M., Glamočlija, J., Ferreira, I. C., Calhelha, R. C., Fernandes, Â., Marković, T., Markovi´c, D., Giweli, A., Soković, M. (2014). Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Industrial Crops and Products*, 52, 183-190.

Nociari, M. M., Shalev, A., Benias, P., & Russo, C. (1998). A novel one-step, highly sensitive fluorometric assay to evaluate cell-mediated cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods*, 213(2), 157-167.

Nordine, A., Bousta, D., El Khanchoufi, A., & El Meskaoui, A. (2013). An efficient and rapid in vitro propagation system of *Thymus hyemalis* Lange, a wild medicinal and aromatic plant of Mediterranean region. *International Journal of Pharma Bioscience and Technology*, 1(3), 118-129.

Nordine, A., Mohamed, H., & Abdelmalek, E. (2014). In vitro clonal propagation through direct shoot organogenesis of *thymus broussonet*ii–a vulnerable aromatic and medicinal plant species. *International Journal of Pharmaceutical Research and Bio-Sciences*, 3(1), 425-439.

Nufarm (2008). Ficha Técnica – Cuprocaffaro (Rot. Ed. 08). Portugal: Nufarm Lda.

O'Brien, P. J., Irwin, W., Diaz, D., Howard-Cofield, E., Krejsa, C. M., Slaughter, M. R., Gao, B., Kaludercic, N., Angeline, A., Bernardi, P., Brain, P., Hougham, C. (2006). High concordance of drug-induced human hepatotoxicity with in vitro cytotoxicity measured in a novel cell-based model using high content screening. *Arch Toxicol*, 80(9), 580-604. doi:10.1007/s00204-006-0091-3

Omidbaigi, R., Fattahi, F., & Alirezalu, A. (2009). Essential oil content and constituents of *Thymus× citriodorus* L. at different phenological stages. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 12(3), 333-337.

Omidbaigi, R., Sefidkon, F., & Hejazi, M. (2005). Essential oil composition of *Thymus× citriodorus* L. cultivated in Iran. *Flavour and Fragrance Journal*, 20(2), 237-238.

Ozudogru, E. A., Kaya, E., Kirdok, E., & Issever-Ozturk, S. (2011). *In vitro* propagation from young and mature explants of thyme (*Thymus vulgaris* and *T. longicaulis*) resulting in genetically stable shoots. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 47(2), 309-320.

Pavela, R. (2010). Antifeedant activity of plant extracts on *Leptinotarsa decemlineata* Say. and *Spodoptera littoralis* Bois. larvae. *Industrial Crops and Products*, 32(3), 213-219.

Promega (2009). Technical Bulletin Griess Reagent System INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCT G2930. USA: Promega Corporation

Rao, U. M., Ahmad, B. A., & Mohd, K. S. (2016). *In vitro* nitric oxide scavenging and anti-inflammatory activities of different solvent extracts of various parts of *Musa paradisiaca*. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 20(5), 1191-1202.

Raschke, W., Baird, S., Ralph, P., & Nakoinz, I. (1978). Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell*, 15(1), 261-267.

Ribeiro, M. O., Gomes, M. d. S., Senna, S. G., Rossetti, M. L. R., & Fonseca, L. d. S. (2004). Evaluation of rapid microplate assays using cellular-viability indicators to determine patterns of susceptibility to isoniazid and rifampin in Mycobacterium tuberculosis strains. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 30(4), 365-370.

Richter, J., & Schellenberg, I. (2007). Comparison of different extraction methods for the determination of essential oils and related compounds from aromatic plants and optimization of solid-phase microextraction/gas chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387(6), 2207-2217.

Rocha, R. P. d. (2011). Avaliação do teor e da composição do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e *Thymus vulgaris* submetidos a processos de secagem e armazenamento. Pós-graduação. Brasil: Universidade Federal de Viçosa

Rodrigues, V. R. F. (2014). Avaliação da atividade anti-inflamatória do óleo essencial de *Thymus zygis subsp. sylvestris* e dos seus compostos principais. Dissertação de Mestrado. Coimbra, Portugal: Universidade de Coimbra.

Romero, A. L., Specian, V., de Oliveira, R. C., & de Souza Diniz, S. S. (2014). Atividade do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) contra fungos fitopatogênicos. *UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde*, 11(4), 15-18.

Rout, G., Samantaray, S., & Das, P. (2000). In vitro manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotechnology Advances*, 18(2), 91-120.

Rubin, S., Lima, C. S. M., Bandeira, J. M., Ribeiro, M. V., & Benitez, L. C. (2007). Reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de *Thymus vulgaris* L. *Revista Brasileira de Biociências*, 5(S2), 480-482.

Saad, A. I., & Elshahed, A. M. (2012). Plant tissue culture media, Recent advances in plant in vitro culture*: InTech*, 2, 29-40. DOI: 10.5772/50569

Santos, R. I., Pereira, D. F., Teodoro, G. R., Del Ciampo, J. O., Ogasawara, M. S., Canettieri, A. C., Khouri, S., Salvador, M. J. (2010). Óleo essencial de *Thymus vulgaris*: Elaboração de enxaguatório bucal e avaliação do efeito *in vitro* na formação da placa bacteriana. *Latin American Journal of Pharmacy*, 29(6): 941-947

Satyal, P., Murray, B. L., McFeeters, R. L., & Setzer, W. N. (2016). Essential oil characterization of *Thymus vulgaris* from various geographical locations. *Foods*, 5(4), 70-82. doi:10.3390/foods5040070

Silva, S. D. J. d. (2014). Caracterização química dos extratos aquosos e hidro-etanólicos de tomilho vulgar (*Thymus vulgaris* L.), tomilho bela-luz (*Thymus mastichina* L.) e tomilho limão (*Thymus x citriodorus* L.) e avaliação da sua toxicidade usando modelos *in vitro*. Dissertação de Mestrado. Vila Real, Portugal: UTAD.

Sobral, M. V., Xavier, A. L., Lima, T. C., & de Sousa, D. P. (2014). Antitumor activity of monoterpenes found in essential oils. *The Scientific World Journal*, 2014.

Steffens, A. H. (2010). Estudo da composição química dos óleos essenciais obtidos por destilação por arraste a vapor em escala laboratorial e industrial. Pós-graduação. Brasil: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Tagami, O. K., Gasparin, M. D. G., Schwan-Estrada, K. R. F., da Silva Cruz, M. E., Itako, A. T., Júnior, J. B. T., de Moraes, L. M., Stangarlin, J. R. (2009). Fungitoxicty of *Bidens pilosa*, *Thymus vulgaris*, *Lippia alba* and *Rosmarinus officinalis* in the in vitro development of phytophatogens fungi. Semina: *Ciências Agrárias*, 30(2), 285-294.

Taghouti, M., Martins-Gomes, C., Schafer, J., Felix, L. M., Santos, J. A., Bunzel, M., Nunes, F. M., Silva, A. M. (2018). *Thymus pulegioides* L. as a rich source of antioxidant, anti-

proliferative and neuroprotective phenolic compounds. *Food Funct*, 9(7), 3617-3629. doi:10.1039/c8fo00456k

Toncer, O., Karaman, S., Diraz, E., Sogut, T., & Kizil, S. (2017). Essential Oil Composition of *Thymus× citriodorus* (Pers.) Schreb. at Different Harvest Stages. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 45(1), 185-189.

von Mühlen, C. (2009). Índices de retenção em cromatografia gasosa bidimensional abrangente. *Sci Chromatogrphica*, 1(3), 21-28.

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. doi:10.1016/j.indcrop.2012.11.002

7. Anexos

7.1. Composição meio de cultura MS (M0222 Duchefa®)

Tabela 9: Meio de cultura MS

Micronutrientes	**mg/L**	**Macronutrientes**	**mg/L**	**Vitaminas**	**mg/L**
$CoCl_2.6H_2O$	0,025	$CaCl_2$	332,02	Glycine	2,00
$CuSO_4.5H_2O$	0,025	KH_2PO_4	170	myo-Inositol	100
FeNaEDTA	36,70	KNO3	1900	Nicotinic acid	0,50
H_3BO_3	6,20	MgSO4	180,54	Pyridoxine HCl	0,50
KI	0,83	NH_4NO_3	1650	Thiamine HCl	0,10
$MnSO_4.H_2O$	16,90				
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,25				
$ZnSO_4.7H_2O$	8,60				
Concentraçao total de Micro e Macronutrientes incluindo Vitaminas: 4405.19 mg/l					

(Murashige and Skoog 1962)

7.2. CUPROCAFFARO

Composição- 50% (p/p) Cobre (sob a forma de oxicloreto de cobre) $3Cu(OH)_2.CuCl_2$

Classificação Toxicológica - Nocivo e Perigoso para o ambiente.

Precauções Toxicológicas, Ecotoxicológicas e Ambientais:

• Manter afastado dos metais.

• Em caso de incêndio e/ou explosão não respirar os fumos.

• Manter afastado dos alimentos e bebidas, incluindo os dos animais.

• Nocivo por inalação.

• Não respirar as poeiras nem a nuvem de pulverização.

• Não comer, beber ou fumar durante a utilização

• Não contaminar a água com este produto ou com a sua embalagem.

• Muito tóxico para os organismos aquáticos, podendo causar efeitos nefastos a longo prazo no ambiente aquático

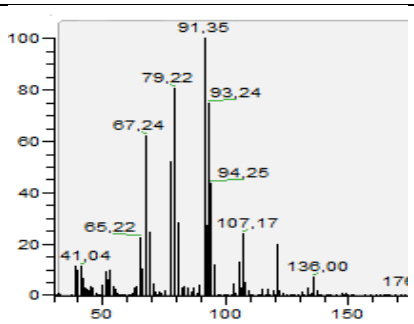
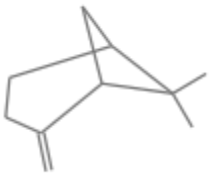
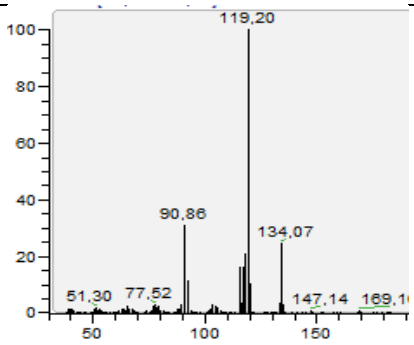
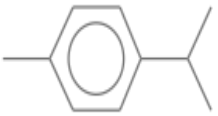
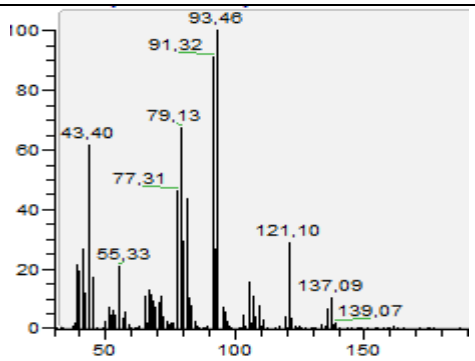
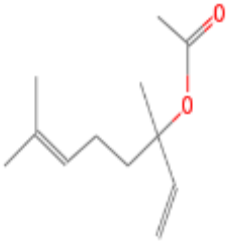
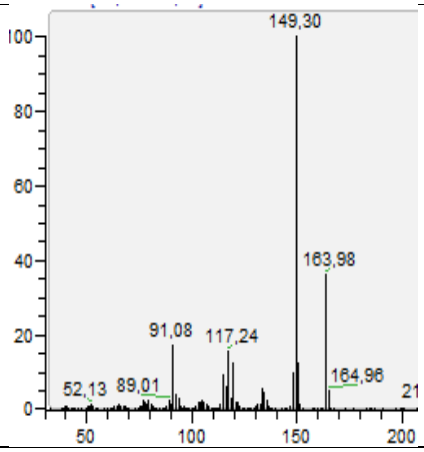
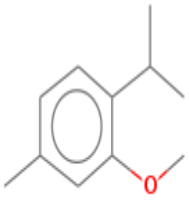
• Após o tratamento lavar bem o material de protecção tendo cuidado especial em lavar as luvas por dentro.

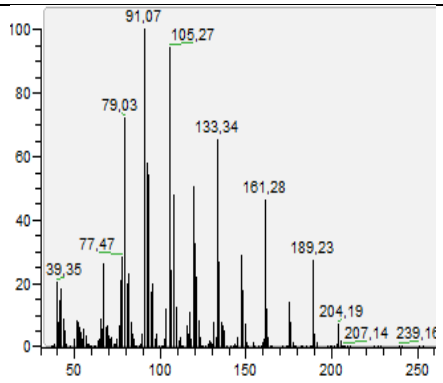
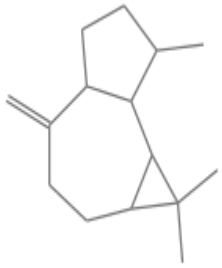
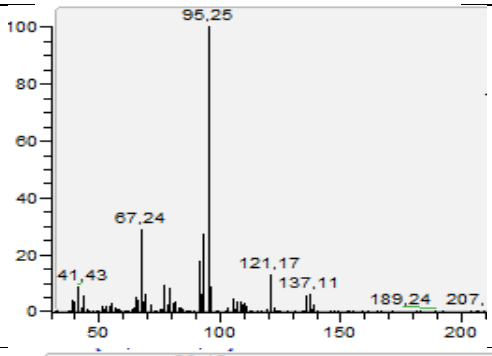
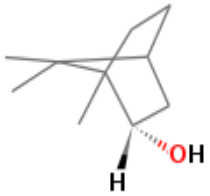
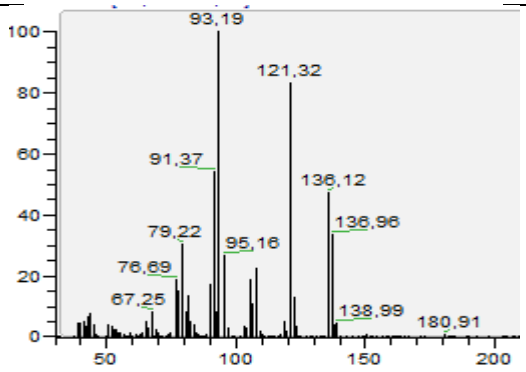
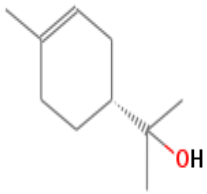
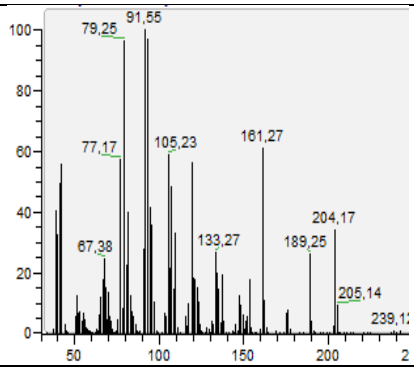
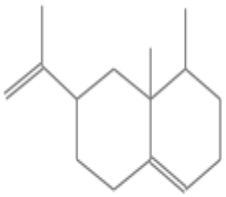
• Intervalo de segurança – 7 dias

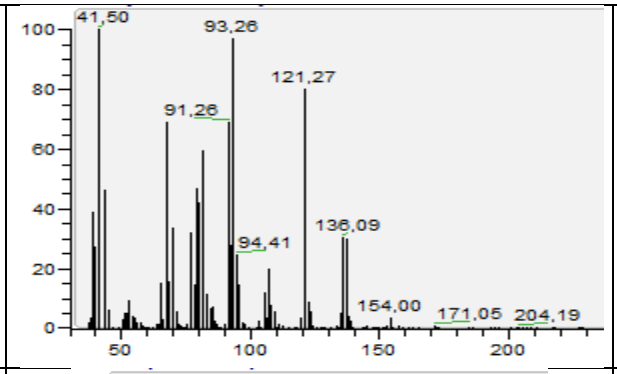
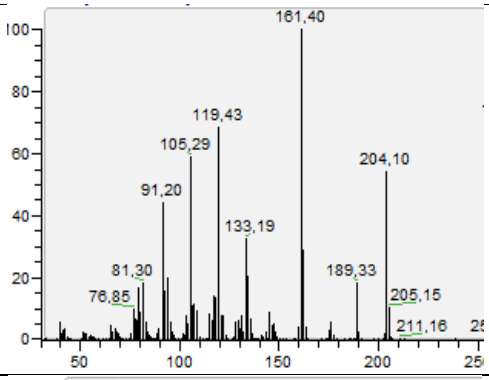
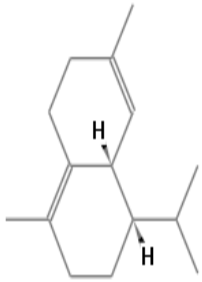
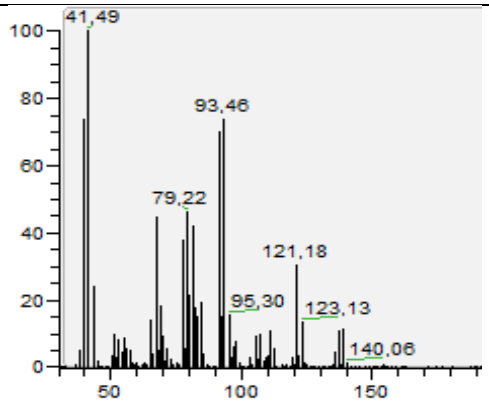
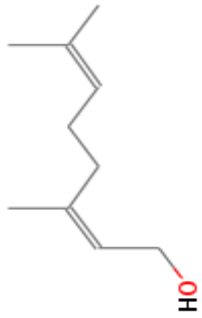
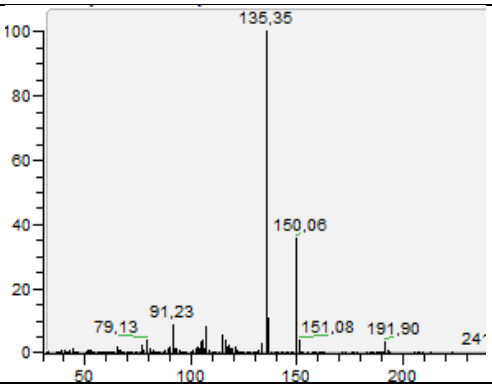
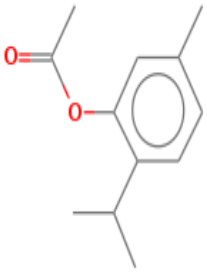
• Tratamento de emergência - Em caso de ingestão, lavar repetidamente a boca com água (apenas se a vítima estiver consciente), consultar imediatamente o médico e mostrar-lhe a embalagem ou o rótulo.

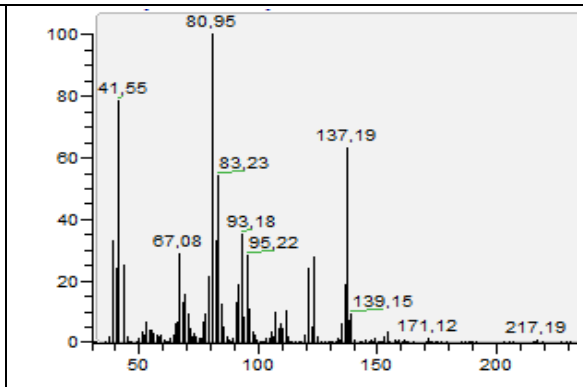
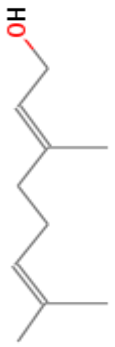
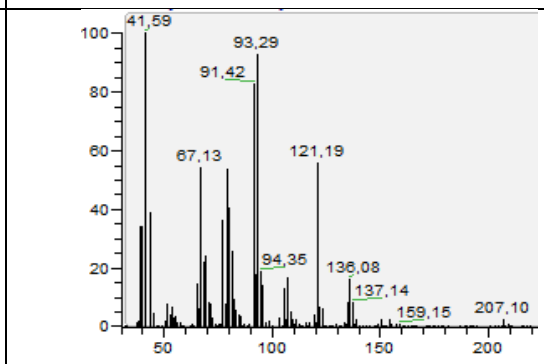
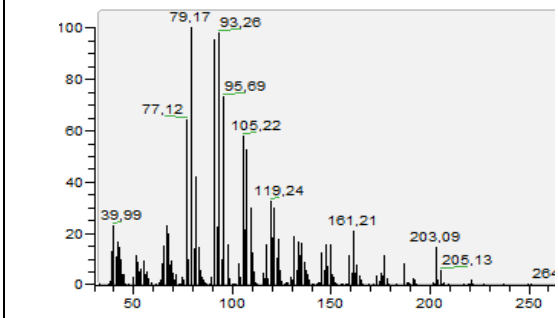
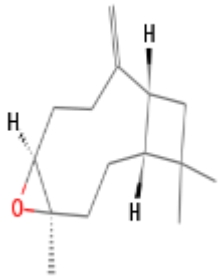
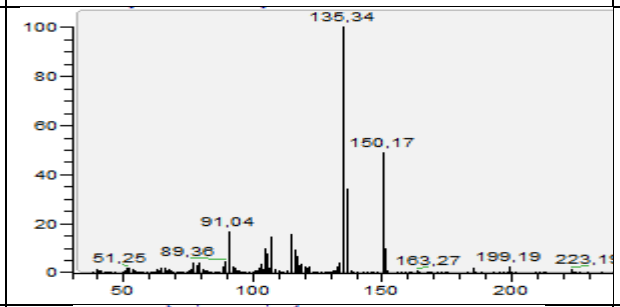
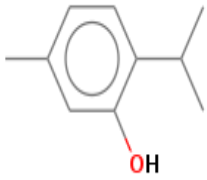
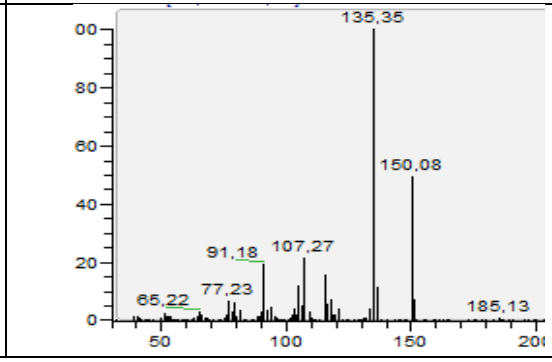
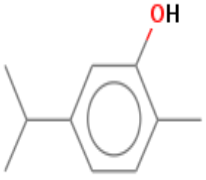
(Nufarm, 2008)

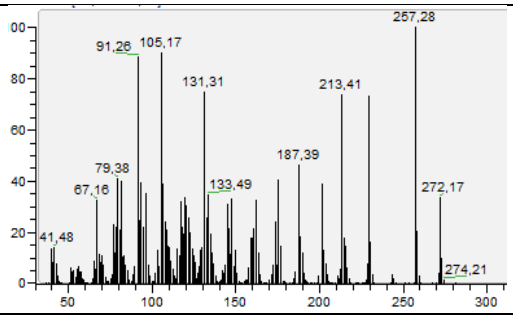
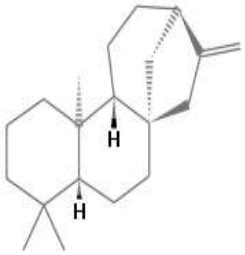
7.3. Composto quimicos

Dados obtidos		Composto	
RI	**Espectro de massa**	**Nome e Fórmula**	**Estrutura química**
1148		β-Pineno $C_{10}H_{16}$	
1230		P-Cymeno $C_{10}H_{14}$	
1560		Acetato de linalila $C_{12}H_{20}O_2$	
1600		Timol metil éter $C_{11}H_{16}O$	

1615		Aromadendreno $C_{15}H_{24}$	
1705		Borneol $C_{10}H_{18}O$	
1710		α-terpineol $C_{10}H_{18}O$	
1756		Valenceno $C_{15}H_{24}$	

1774		Butirato de citronelulose $C_{14}H_{26}O_2$	
1780		Delta cadineno $C_{15}H_{24}$	
1816		Nerol $C_{10}H_{18}O$	
1861		Acetato de timol $C_{12}H_{16}O_2$	

1879		Geraniol $C_{10}H_{18}O$	
1920		Butirato de geranilo $C_{14}H_{24}O$	
1993		Óxido de Cariofileno $C_{15}H_{24}O$	
2193		Timol $C_{10}H_{14}O$	
2219		Carvacrol $C_{10}H_{14}O$	

2435		α-Kaureno $C_{20}H_{32}$