



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências da Saúde

Caracterização e avaliação das atividades antimicrobiana, antioxidante e citotóxica de extratos da planta *Cistus ladanifer*, para aplicação em produtos cosméticos

Leonor Freire Pires Ramos

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Biomédicas
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof^a. Doutora Ana Palmeira de Oliveira
Co-orientador: Prof^a. Doutora Fernanda Delgado

Covilhã, junho de 2019

Dedicatória

Dedico esta dissertação aos meus pais e ao meu irmão, por toda a compreensão, paciência e apoio prestado ao longo desta minha vida acadêmica.

Agradecimentos

Esta etapa não poderia terminar sem um especial agradecimento àqueles que me acompanharam e apoiaram nesta caminhada, àqueles que me inspiraram a lutar pelos meus sonhos e, acima de tudo, àqueles que não me deixaram desistir deles.

Às minhas orientadora e coorientadora,

agradeço pela oportunidade que me proporcionaram de integrar este projeto e de desenvolver este trabalho de investigação. Um percurso que não foi fácil mas certamente muito gratificante e enriquecedor. Obrigada, Professora Doutora Ana Palmeira de Oliveira e Professora Doutora Fernanda Delgado, pelo apoio, otimismo e disponibilidade sempre demonstrados, pelos ensinamentos e pelas ferramentas científicas e práticas que me inculcaram e, em particular, pelo entusiasmo que colocam na investigação científica. A vossa sempre constante procura de novas metas, não me fizeram parar de lutar para estar à altura delas e cada meta ultrapassada representou uma pequena vitória para mim. Obrigada por este desafio às minhas capacidades.

À equipa,

agradeço o modo como fui recebida. Em particular, ao Professor Doutor José Martinez de Oliveira e à Professora Doutora Rita Palmeira de Oliveira pela sempre disponibilidade de ajuda e por serem um exemplo a seguir, e aos colegas e investigadores Carlos Gaspar, Joana Rolo, Ana Oliveira e Cátia Vaz, pela sempre prontidão dispensada e ajuda tão necessária nos momentos de mais aperto, pelas horas de companhia no laboratório, pelos conselhos e pelas palavras de ajuda e, principalmente, por terem contribuído com os vossos conhecimentos em parte desta minha formação académica.

Às empresas colaboradoras,

Aromas do Valado® e Ervitas Catitas®, agradeço a cedência dos óleos essenciais e dos hidrolatos, indispensáveis para este estudo.

Ao CICS-UBI,

agradeço por me permitir o primeiro contacto com as práticas laboratoriais, por me disponibilizar os meios necessários para o desenvolvimento deste projeto e por ter sido a minha casa neste processo de aprendizagem científica.

Ao CBP-BI,

agradeço pelo acolhimento laboratorial e pela oferta de recursos necessários ao desenvolvimento deste projeto. Agradeço a todos aqueles com quem contactei e, em especial, à Daniela Coutinho pelo apoio e pelos ensinamentos que me transmitiu.

À AAUBI,

que me acompanhou, lado a lado, durante toda esta fase e que foi a minha casa nas horas vagas. Agradeço pela experiência que me proporcionou enquanto dirigente associativa, pelos valores que me inculuiu enquanto pessoa, pelos projetos que pude abraçar, pelos momentos que jamais esquecerei e pelos amigos que para sempre guardarei.

Aos meus amigos,

que o destino colocou na minha vida para sempre. Sou grata por me terem acompanhado nesta aventura, pela vossa amizade, por tudo o que vivemos juntos e por tornarem o difícil parecer fácil. Obrigada Joana, Mafalda, Mariana, Paulo, Rita, Inês, Ana, Joana, Patrícia e Pedro.

À minha família,

tios e tias, primos e primas, e avó, agradeço o carinho e apoio incondicional.

Ao Francisco,

que entrou na minha vida no final desta fase e que, mesmo assim, ficou nela. Agradeço pela paciência, pelo apoio, pelo conforto e pelo amor.

Aos meus pais e ao Guilherme,

agradeço pelo amor e carinho, por toda a paciência e apoio incondicional, e por me darem a força que muitas vezes precisei para seguir em frente.

Resumo

Na sociedade atual, os produtos cosméticos desempenham um papel de extrema importância no bem-estar físico, psicológico e social de um indivíduo, forçando a indústria cosmética a criar produtos eficazes, seguros e que acompanhem as crescentes exigências dos consumidores.

Os conservantes são adicionados aos produtos cosméticos com o objetivo de evitar a sua contaminação por microrganismos, durante todo o seu tempo de vida útil, mantendo a qualidade do mesmo e diminuindo o risco de potenciais infecções para o utilizador. Os compostos conservantes permitidos em formulações cosméticas encontram-se listados no Regulamento 1223/2009, sendo que as opções são limitadas e ao longo dos últimos anos tem-se verificado a remoção de algumas moléculas sem que fossem substituídas por outras mais eficazes e seguras. Desta forma, urge a necessidade de encontrar substitutos conservantes que sejam eficazes e seguros.

Substâncias de origem natural com propriedades antimicrobianas, tais como óleos essenciais e hidrolatos de plantas aromáticas, surgem como alternativa possível para aplicação como conservantes em produtos cosméticos. A atividade antioxidante, também demonstrada por este tipo de extratos, tem sido considerada não só pelo seu potencial conservante da formulação mas também pelo interesse no uso enquanto ingrediente ativo em produtos cosméticos anti-envelhecimento.

A planta *Cistus ladanifer*, também conhecida por Esteva, é uma planta aromática de climas mediterrâneos, que existe em elevada quantidade em Portugal e cujos óleos essenciais têm sido recentemente analisados e avaliados quanto às suas atividades biológicas.

Este estudo procura, então, analisar quimicamente quatro extratos de *Cistus ladanifer*, dois óleos essenciais e dois hidrolatos, e estudá-los quanto às suas atividades antimicrobiana, antioxidante e citotóxica, com o objetivo de serem utilizados como ingredientes conservantes em formulações cosméticas.

Os resultados obtidos permitiram concluir que a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais confere-lhes a potencialidade de serem utilizados como ingredientes conservantes em produtos cosméticos, bem como a sua atividade antioxidante lhes confere a capacidade de serem utilizados como ingredientes em produtos cosméticos anti-envelhecimento. Contudo, a impossibilidade de analisar a sua atividade citotóxica torna, nesta abordagem, inconclusiva a sua segurança.

A atividade antimicrobiana dos hidrolatos, ainda que menor que a dos óleos essenciais, e os seus baixos índices de citotoxicidade, tornam plausível a sua utilização em sistemas

conversantes em produtos cosméticos. A sua inexistente atividade antioxidante não lhes confere um valor acrescido na área do anti-envelhecimento.

Este estudo constituiu uma avaliação primária às potencialidades destes extratos, pelo que, futuramente, devem desenvolver-se estudos que incluam outras avaliações quer de eficácia quer de segurança.

Palavras-chave

Produtos Cosméticos, *Cistus ladanifer*, Óleo Essencial, Hidrolato, Atividade Antimicrobiana, Atividade Antioxidante, Atividade Citotóxica.

Abstract

In today's society, cosmetic products play an extremely important role in the physical, psychological and social well-being of an individual, forcing the cosmetics industry to create effective, safe products that accompany the growing demands of consumers.

Preservatives are added to cosmetic products with the aim of avoiding their contamination by microorganisms throughout their lifespan while maintaining the quality of the product and decreasing the risk of potential infections for the user. The preservative compounds allowed in cosmetic formulations are listed in Regulation 1223/2009, with the options being limited and over the last few years the removal of some molecules has been verified without being replaced by other more effective and safe ones. In this way, it is imperative to find effective and safe substitutes for preservatives. Thus, there is an urgent need to find preservatives that are effective and safe.

Substances of natural origin with antimicrobial properties, such as essential oils and hydrolates of aromatic plants, emerge as a possible alternative for application as preservatives in cosmetic products. The antioxidant activity, also demonstrated by this type of extracts, has been considered not only by its potential preservative of the formulation but also by the interest in use as an active ingredient in anti-aging cosmetic products.

The plant *Cistus ladanifer*, also known as Esteva, is an aromatic plant of Mediterranean climates, which exists in high quantity in Portugal and whose essential oils have been recently analyzed and evaluated for their biological activities.

This study seeks to chemically analyze four extracts of *Cistus ladanifer*, two essential oils and two hydrolates, and study them on their antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities, with the objective of being used as Preservatives in cosmetic formulations.

The results obtained allow us to conclude that the antimicrobial activity of essential oils gives them the potentiality of being used as preservative ingredients in cosmetic products, as well as their antioxidant activity confers on them ability to be used as ingredients in anti-aging cosmetic products. However, the impossibility of analyzing its cytotoxic activity makes its safety inconclusive in this approach.

The antimicrobial activity of hydrolates, although lower than that of essential oils, and their low cytotoxicity indexes, make it plausible to use them in preservative systems in cosmetic products. Its non-existent antioxidant activity does not give them an added value in the anti-aging area.

This study was a primary assessment of the potential of these extracts, and studies should be developed in the future, including other assessments of both effectiveness and safety.

Keywords

Cosmetic Products, *Cistus ladanifer*, Essential Oil, Hidrolate, Antimicrobial Activity, Antioxidant Activity, Citotoxic Activity.

Visão Geral

Esta tese de atribuição ao grau de mestre em Ciências Biomédicas está estruturada em 8 capítulos, mais anexos, a seguir resumidos:

Capítulo 1, encontra-se dividido em três partes. Na primeira são feitas algumas considerações sobre o que é a cosmética e as algumas das suas áreas de aplicação, de seguida é feita uma breve apresentação àquilo que é um óleo essencial, quais as suas aplicações na área da cosmética e como se obtém um hidrolato, por fim, é abordada a planta *Cistus ladanifer* como produtora destes extratos.

Capítulo 2, caracteriza quimicamente os extratos da planta *Cistus ladanifer* utilizados para este estudo.

Capítulo 3, discute e analisa *in vitro* a atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos de *Cistus ladanifer*.

Capítulo 4, discute e analisa *in vitro* a atividade antioxidante dos extratos de *Cistus ladanifer*.

Capítulo 5, discute e analisa *in vitro* a atividade citotóxica dos extratos de *Cistus ladanifer*.

Capítulo 6, discute, conjuntamente, os resultados apresentados nos três capítulos anteriores (capítulos 3, 4 e 5).

Capítulo 7, apresenta a conclusão do estudo, bem como as perspectivas futuras relativas ao trabalho de investigação.

Capítulo 8, compila as referências bibliográficas que auxiliaram na construção desta dissertação.

Anexos, apresenta informação considerada relevante para o desenvolvimento do trabalho principal.

Índice

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO TEÓRICA	1
1.1. Cosméticos	2
1.1.1. Definição e Legislação dos Cosméticos	3
1.1.2. Preservação Cosmética	4
1.1.2.1. Toxicidade dos conservantes químicos	6
1.1.2.2. Eficácia antimicrobiana do sistema de preservação cosmético	8
1.1.3. Antioxidantes na Cosmética	9
1.2. Óleo Essencial	10
1.2.1. Aplicações Tradicionais e Atuais Dos Óleos Essenciais	11
1.2.2. Óleos Essenciais como Agentes Antimicrobianos	13
1.2.2.1. Mecanismo de ação antimicrobiana do óleo essencial	14
1.2.2.2. Toxicidade dos óleos essenciais.....	15
1.2.3. Óleos Essenciais como Agentes Antioxidantes	16
1.2.4. Hidrolato: Um subproduto da destilação dos Óleos Essenciais	17
1.3. <i>Cistus ladanifer</i>	17
1.3.1. Taxonomia e Filogenia	17
1.3.2. Distribuição Geográfica.....	18
1.3.3. Morfologia e Biologia Reprodutiva	19
1.3.4. Tipos de Extratos	21
1.3.5. Caracterização Química dos Extratos	22
1.3.5.1. Família dos terpenos.....	22
1.3.5.2. Flavonoides e Compostos Fenólicos	24
1.3.6. Atividades Biológicas dos Extratos.....	26
1.3.6.1. Atividade Antimicrobiana	26
1.3.6.2. Atividade Antioxidante	27
1.3.6.3. Atividade Citotóxica	27
1.4. Objetivo Geral	32
CAPÍTULO 2 - CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA	33
2.1. Considerações Gerais	34
2.1.1. Objetivo	35
2.2. Parte Experimental.....	35

2.2.1.	Materiais e Métodos	35
2.2.1.1.	Análises Fitoquímicas dos Hidrolatos	35
2.2.1.2.	Identificação e Quantificação dos Compostos: Óleo Essencial e Hidrolato ..	37
2.2.2.	Resultados e Discussão	37
2.3.	Conclusão	42
CAPÍTULO 3 - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA		43
3.1.	Considerações Gerais	44
3.1.1.	Objetivo	44
3.2.	Parte Experimental.....	45
3.2.1.	Materiais e Métodos	45
3.2.1.1.	Estirpes.....	45
3.2.1.2.	Reagentes.....	46
3.2.1.3.	Determinação da Concentração Mínima Inibitória.....	48
3.2.1.4.	Determinação da Concentração Mínima Letal.....	51
3.2.2.	Esquema representativo da metodologia aplicada	52
3.2.3.	Tratamento dos resultados	55
3.3.	Resultados e Discussão	56
3.4.	Conclusões e Perspetivas Futuras.....	61
CAPÍTULO 4 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE		63
4.1.	Considerações Gerais	64
4.1.1.	Objetivo	65
4.2.	Parte Experimental.....	65
4.2.1.	Materiais e Métodos	65
4.2.1.1.	Reagentes.....	65
4.2.1.2.	Determinação da capacidade antioxidante por redução do DPPH.....	65
4.2.2.	Esquema representativo da metodologia aplicada	69
4.2.3.	Tratamento dos resultados	74
4.3.	Resultados e Discussão	75
4.4.	Conclusões e Perspetivas Futuras.....	79
CAPÍTULO 5 - ATIVIDADE CITOTÓXICA.....		81
5.1.	Considerações Gerais	82
5.1.1.	Objetivo	83
5.2.	Parte Experimental.....	83

5.2.1.	Materiais e Métodos	83
5.2.1.1.	Células.....	83
5.2.1.2.	Reagentes.....	83
5.2.1.3.	Determinação da Citotoxicidade <i>in vitro</i> : Ensaio MTT.....	84
5.2.2.	Esquema representativo da metodologia aplicada	86
5.2.3.	Tratamento dos resultados	89
5.3.	Resultados e Discussão.....	90
5.3.1.	Ensaio MTT: H-AV e H-EC.....	90
5.3.2.	Ensaio MTT: OE-EC	95
5.4.	Conclusões e Perspetivas Futuras.....	98
CAPÍTULO 6 - DISCUSSÃO GERAL		99
CAPÍTULO 7 - CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS		103
CAPÍTULO 8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		105
ANEXOS.....		113
Anexo 1 - Documento para reavaliação de um ingrediente cosmético ou para a entrada de um novo no mercado, publicado pelo SCCS.		114
Anexo 2 - Identificação e quantificação dos compostos presentes nos óleos essenciais em estudo.....		119
Anexo 3 - Validação do método do DMSO como emulsionante na análise atividade antimicrobiana		121
Anexo 4 - Validação do método do Tween 20 como emulsionante e da resazurina como marcador do crescimento microbiano		123
Anexo 5 - Validação do método do DMSO como emulsionante do óleo essencial na análise da atividade citotóxica		125
Anexo 6 - Comunicações científicas apresentadas ao longo do desenvolvimento da dissertação		126

Índice de Figuras

Figura 1 - Fotografias da planta <i>Cistus ladanifer</i>	21
Figura 2 - Fotografias dos resultados obtidos para o teste de Salkowski para os hidrolatos.. .	38
Figura 3 - Fotografias dos resultados obtidos para o teste de Liebermann Burchardt para os hidrolatos.....	39
Figura 4 - Fotografias dos resultados obtidos para o teste de Cloreto de Ferro para os hidrolatos.. ..	39
Figura 5 - Fotografia do teste de Folin Cicalteou.	39
Figura 6 - Conversão do composto resazurina no composto resafurina.	47
Figura 7 - Aspeto da solução de trabalho do OE-EC.	47
Figura 8 - Esquema representativo da metodologia geral aplicada na determinação da atividade antimicrobiana dos extratos	53
Figura 9 - Representação esquemática da placa de 96 poços no ensaio para determinar a CMI para os hidrolatos.....	54
Figura 10 - Representação esquemática da placa de 96 poços no ensaio para determinar a CMI para o OE-AV.....	54
Figura 11 - Reação de redução do DPPH.....	64
Figura 12 - Esquema representativo da metodologia aplicada para avaliar a capacidade antioxidante dos extratos: preparação da placa de 96 poços para o óleo essencial.	69
Figura 13 - Esquema representativo da metodologia aplicada para avaliar a capacidade antioxidante dos extrato.	70
Figura 14 - Esquema representativo da metodologia aplicada para avaliar a capacidade antioxidante dos extratos: preparação da placa de 96 poços para o DPPH.	70
Figura 15 - Representação esquemática da placa de 96 poços para a determinação do EC50 do óleo essencial, na análise da atividade antioxidante.	71
Figura 16 - Fotografia da placa de 96 poços para a determinação do EC50 do óleo essencial, na análise da atividade antioxidante.	71
Figura 17 - Representação esquemática da placa de 96 poços para a determinação do EC50 do ácido ascórbico, na análise da atividade antioxidante.....	72
Figura 18 - Fotografia da placa de 96 poços para a determinação do EC50 do ácido ascórbico, na análise da atividade antioxidante.....	72
Figura 19 - Representação esquemática da placa de 96 poços no ensaio do DPPH para a determinação do EC50, na análise da atividade antioxidante.	73
Figura 20 - Fotografia da placa de 96 poços do composto DPPH, na análise da atividade antioxidante.	73
Figura 21 - Conversão do composto tetrazólio no composto formazano.....	82
Figura 22 - Esquema representativo da metodologia aplicada na execução do ensaio MTT para avaliação da atividade citotóxica do extrato hidrolato.	87

Figura 23 - Representação esquemática da placa de 96 poços no ensaio MTT para os hidrolatos.	88
Figura 24 - Representação esquemática da placa de 96 poços no ensaio MTT para o OE-EC. .	88
Figura 25 - Fotografia de partes do ensaio de MTT realizado do OE-EC.	97

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Organização taxonómica da planta <i>Cistus ladanifer</i>	18
Tabela 2 - Principais compostos da família dos terpenos presentes em análises de caracterização química de extratos de <i>Cistus ladanifer</i>	24
Tabela 3 - Principais compostos flavonoides presentes em análises de caracterização química de extratos de <i>Cistus ladanifer</i>	25
Tabela 4 - Principais compostos fenólicos presentes em análises de caracterização química de extratos de <i>Cistus ladanifer</i>	26
Tabela 5 - Tabela resumo de investigações desenvolvidas com a planta <i>Cistus ladanifer</i>	29
Tabela 6 - Detalhes dos extratos em estudo.	34
Tabela 7 - Tabela indicativa do extrato e das atividades avaliadas para cada amostra.	35
Tabela 8 - Tabela com os resultados obtidos para os testes de Salkowski, de Liebermann Burchardt e do Cloreto de Ferro para os hidrolatos, H-AV e H-EC.	38
Tabela 9 - Resultados obtidos para a quantificação dos fenóis totais dos hidrolatos, H-AV e H-EC, pelo teste Folin Ciocalteu.	39
Tabela 10 - Composição química dos hidrolatos da planta <i>C. ladanifer</i> , em estudo.	40
Tabela 11 - Estirpes, bacterianas e fúngicas, utilizadas no estudo da atividade antimicrobiana.	45
Tabela 12 - Tabela resumo das diferentes soluções preparadas para a análise antimicrobiana: concentração de óleo essencial e percentagem de emulsionante.	48
Tabela 13 - Tabela resumo das concentrações de extrato utilizadas para testar a atividade antimicrobiana de cada um deles.	49
Tabela 14 - Valores de CMI ($\mu\text{l/ml}$) e CML ($\mu\text{l/ml}$) de OE-AV e de OE-EC, para oito estirpes de microrganismos, para a análise da atividade antimicrobiana do OE-AV e do OE-EC.	58
Tabela 15 - Tabela resumo da gama de concentrações para analisar a atividade antioxidante dos extratos.	68
Tabela 16 - Valores de EC50 do OE-EC e do ácido ascórbico.	76
Tabela 17 - Tabela resumo das concentrações utilizadas para testar a atividade citotóxica dos extratos.	86
Tabela 18 - Tabela com os valores de IC50 ($\mu\text{l/ml}$) para cada uma das linhas celulares (3T3 e HaCat) na presença dos hidrolatos, H-AV e H-EC.	93
Tabela 19 - Composição dos óleos essenciais de <i>C. ladanifer</i>	119

Índice de Gráficos

Gráfico 1 - Representação gráfica da percentagem de crescimento bacteriano e fúngico, após exposição, de respetivamente 24 h ou 48 h, a diferentes concentrações ($\mu\text{l/ml}$) de H-AV e de H-EC..	57
Gráfico 2 - Perfil antioxidante do OE-EC.	75
Gráfico 3 - Perfil antioxidante do ácido ascórbico.	76
Gráfico 4 - Atividade citotóxica do H-AV para as linhas celulares 3T3 e HaCat, após uma exposição de 24 h a diferentes concentrações ($\mu\text{l/ml}$) deste extrato.	90
Gráfico 5 - Atividade citotóxica H-EC para as linhas celulares 3T3 e HaCat, após uma exposição de 24 h a diferentes concentrações ($\mu\text{l/ml}$) deste extrato.	91
Gráfico 6 - Perfil de citotoxicidade do H-AV, para cada uma das linhas celulares em estudo, e respetivas linhas de tendência utilizadas para determinar o IC50 do H-AV para cada linha celular	93
Gráfico 7 - Perfil de citotoxicidade do H-EC, para cada uma das linhas celulares em estudo, e respetivas linhas de tendência utilizadas para determinar o IC50 do H-EC para cada linha celular	93

Lista de Acrónimos

ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosina Trifosfato
CMI	Concentração Mínima Inibitória
CML	Concentração Mínima Letal
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DPPH	α -diphenyl- β -picrylhydrazyl
ERO	Espécies Reativas de Oxigénio
FDA	Food and Drug Administration
GC-MS	Gas Chromatography - Mass Spectrometry
H-AV	Hidrolato da empresa Aromas do Valado®
H-EC	Hidrolato da empresa Ervitas Catitas®
INFARMED	Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P.
ISO	International Standard Organization
MHB	Mueller-Hinton Broth
MOPS	Ácido Morfolinopropanesulfónico
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
OE-AV	Óleo Essencial da empresa Aromas do Valado®
OE-EC	Óleo Essencial da empresa Ervitas Catitas®
PDA	Patato-Dextrose Agar
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SCCS	Scientific Committee on Consumer Safety
SDA	Sabouraud-Dextrose Agar
TSA	Tryptic Soy Agar
UFC	Unidades Formadoras de Colónias

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO TEÓRICA

1.1. Cosméticos

Não existe uma altura específica para datar a criação dos cosméticos, no entanto, é sabido que estes são utilizados há milhares de anos com o propósito de proteger o corpo contra elementos naturais e contra os efeitos que estes podem causar no organismo humano, existindo relatos da utilização de óleos, argilas e derivados de plantas para proteção contra queimaduras solares, secura da pele provocada pelo frio e de irritações por picadas de insetos (1).

Na sociedade atual, os cosméticos estão associados a um contexto um pouco diferente. A aparência desempenha um papel de extrema importância para o bem-estar físico, psicológico e social de uma pessoa. Indivíduos que se sentem bem com eles próprios acabam por se inserir de forma mais positiva na sociedade, sendo mais cooperativos, mais dominantes, mais desinibidos, mais sociais e mais positivos. A longo prazo, todos estes fatores acabam por se refletir nos demais diversos campos da vida, desde melhores e mais sucedidas carreiras, a melhores relacionamentos interpessoais (1,2). Desta forma, os cosméticos são atualmente utilizados para higiene pessoal e proteção de fatores ambientais, para prevenir o envelhecimento, e, em geral, para ajudar as pessoas a terem uma vida mais plena e recompensadora (1).

Em 2014, o mercado global de cosméticos foi avaliado em 460 bilhões de dólares, estimando-se que este valor aumente até 675 bilhões de dólares em 2020. Este mercado em crescimento requer um acompanhamento constante da indústria cosmética que procura criar produtos que colmatem e preencham as crescentes exigências e necessidades da sociedade, no que concerne à inovação e segurança dos mesmos (3).

Uma das grandes preocupações da indústria cosmética é o modo como os seus produtos são preservados. Sem um sistema de preservação eficiente, o produto pode sofrer modificações que o poderão detorar e colocar em causa a saúde do utilizador. Estas modificações surgem, muitas vezes, como resultado de contaminações por microrganismos que encontram no produto cosmético um meio nutritivo para crescerem. Desta forma, como inibição do crescimento dos microrganismos, devem ser utilizados conservantes antimicrobianos, de origem natural ou sintética, que sejam eficazes para um elevado espectro de espécies, que tenham uma duração maior do que a validade do próprio produto cosmético e que não promovam a adaptação e a resistência dos microrganismos (3). Os agentes antimicrobianos podem, ainda, ser utilizados como princípio ativo em produtos cosméticos com efeito antimicrobiano, contudo as suas concentrações terão de ser bastante superiores às necessárias para um efeito conservante deste tipo de produtos (3).

1.1.1. Definição e Legislação dos Cosméticos

De acordo com o Artigo 2.1 (a) do Regulamento Europeu n.º 1223/2009, um produto cosmético é definido como “qualquer substância ou mistura destinada a ser posta em contacto com as partes externas do corpo humano (epiderme, sistemas piloso e capilar, unhas, lábios e órgãos genitais externos) ou com os dentes e as mucosas bucais, tendo em vista, exclusiva ou principalmente, limpá-los, perfumá-los, modificar-lhes o aspeto, protegê-los, mantê-los em bom estado ou corrigir os odores corporais”. Este documento define ainda, no Artigo 2.1 (b), como substância “um elemento químico e os seus compostos, no estado natural ou obtidos por qualquer processo de fabrico, incluindo todos os aditivos necessários para preservar a sua estabilidade e todas as impurezas derivadas do processo utilizado, mas excluindo todos os solventes que possam ser separados sem afetar a estabilidade da substância nem alterar a sua composição” e, no Artigo 2.1 (c), como mistura “uma mistura ou solução composta por duas ou mais substâncias” (4).

Portanto, de forma geral, um cosmético é qualquer preparação a ser aplicada no corpo humano (pele, olhos, boca, cabelo ou unhas) com a finalidade de limpar, melhorar a aparência, dar cheiro ou proteger o mesmo, sendo constituída por um conjunto de substâncias como elementos específicos (ou “ativos”), conservantes, corantes (se necessário) e perfumes, que, de acordo com a utilização pretendida, podem estar na forma líquida, sólida ou semissólida (1).

A “cosmecêutica” é um termo que surge, muitas vezes, associado à cosmética e que resulta da combinação de produtos cosméticos com produtos farmacêuticos. Este define produtos que têm um efeito benéfico para a pele mas que não se consideram como tendo um efeito terapêutico biológico. Este termo permanece bastante controverso entre a comunidade científica pelo que ainda não apresenta um estatuto legal que o proteja (3).

Todos os produtos cosméticos devem ser seguros e não podem alterar ou danificar o equilíbrio fisiológico da pele (1). Para avaliar um produto cosmético devem ser tidas em conta todas as suas características (campo de aplicação, funções, forma de preparação, idade do consumidor, género, entre outras consideradas relevantes) e deve ser realizada uma avaliação caso a caso segundo os regulamentos recomendados no mercado, nomeadamente na União Europeia, nos Estados Unidos e no Japão, em que o produto cosmético se insere (3,4).

Na União Europeia (UE), o Regulamento da Comissão Europeia (CE) n.º 1223/2009 relativo aos produtos cosméticos é o principal quadro regulamentar dos produtos cosméticos acabados quando colocados neste mercado. O regulamento substitui a Directiva 76/768/CE, adotada em 1976 e revista em numerosas ocasiões. Para além de fortalecer a segurança dos produtos cosméticos e de simplificar a estrutura para todos os operadores do setor, ele fornece um regime robusto e reconhecido internacionalmente, levando em consideração os mais recentes desenvolvimentos tecnológicos, incluindo o possível uso de nanomateriais. As regras anteriores sobre a proibição de testes em animais não foram modificadas. Este documento pode vir a ser

alvo de alterações sempre que aprovadas (5). O documento “Notas de orientação para o teste de ingredientes cosméticos e avaliação da sua segurança, 10.^a revisão” compila todos os testes e processos necessários para avaliar a segurança de ingredientes cosméticos na União Europeia e foi publicado pelo *Scientific Committee on Consumer Safety* (SCCS) (6). Em Portugal, após o início da comercialização destes produtos, estes são controlados pelo INFARMED, autoridade nacional competente para tal fiscalização (7).

Nos Estados Unidos, as duas leis mais importantes relativas à comercialização de cosméticos são a Lei Federal de Alimentos, Medicamentos e Cosméticos (Lei FD & C, em inglês) e a Lei da Embalagem e Rotulagem Justas (FPLA, em inglês), entre as quais a *Food and Drug Administration* (FDA) se regula (8). A FDA é, então, responsável pelo controlo dos produtos cosméticos, protegendo os consumidores de produtos inseguros e enganosamente rotulados ou embalados, após a sua colocação no mercado interestadual (3,8).

No Japão, os cosméticos são regulamentados pelo Ministério da Saúde, Trabalho e Bem-Estar (MHLW, em inglês) sob a Lei de Assuntos Farmacêuticos (PAL, em inglês) e são divididos em “quase-drogas” e cosméticos (3).

1.1.2. Preservação Cosmética

Todos os produtos, incluindo os produtos cosméticos, que contenham água e compostos orgânicos e inorgânicos estão expostos a contaminações microbianas, durante todo o seu ciclo de vida, recorrentes da fabricação, sendo considerada uma contaminação primária, e/ou da utilização pelo consumidor, sendo uma contaminação secundária (3). Todas as fontes de potenciais contaminações devem ser identificadas e monitorizadas sendo que, para isso, devem ser consideradas 4 etapas: inspeção e controle de matérias-primas (1), processo de fabrico (2), entrega do produto (3) e utilização por parte do consumidor (4) (3).

Estudos mostram que os microrganismos mais frequentemente encontrados em produtos cosméticos contaminados incluem *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca*, *Burkholderia cepacia*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Enterobacter gergoviae*, *Serratia marcescens*, entre outras bactérias, fungos e leveduras. Ainda que a pele e as membranas mucosas estejam protegidas contra microrganismos, a sua presença nestes produtos e posterior utilização pelo consumidor, aumentam o risco de infeção microbiana (3).

Assim, estes produtos necessitam de um sistema de preservação adequado que iniba a proliferação dos microrganismos, evitando a sua degradação tanto na embalagem original como durante a utilização pelo consumidor, e que garanta que a carga microbiana no produto não compromete nem a sua qualidade nem a segurança do utilizador, protegendo-o de potenciais infeções, principalmente por agentes patogénicos quando em contacto com pele danificada (3,9,10).

A indústria cosmética utiliza diferentes estratégias para evitar a contaminação microbiana. A preservação passa pela adição de um ingrediente químico sintético ou natural, com propriedades conservantes, ao produto cosmético, e que se encontra legislado pelos regulamentos em vigor para utilização neste tipo de produtos. Já a autopreservação ou preservação livre é uma preservação sem a adição destes ingredientes químicos considerados como conservantes pela legislação cosmética (3).

A “Tecnologia Hurdle” é um conceito apresentado por vários autores que surge como uma estratégia de autopreservação. Trata-se de uma combinação inteligente de diversos fatores de preservação ou obstáculos que impedem o crescimento de microrganismos no produto cosmético, sem a adição de conservantes químicos sintéticos. O seu objetivo é bloquear gradualmente o crescimento dos microrganismos, colocando no seu caminho vários obstáculos que levam à redução do seu número de modo que, à medida que o número de obstáculos aumenta, o número de sobreviventes será cada vez menor chegando, eventualmente, a eliminar o total a população inicial de microrganismos (3,9).

Neste momento, a indústria cosmética contempla duas etapas para a garantia da qualidade microbiológica e consequentemente da preservação de produtos cosméticos (3).

A estratégia primária de preservação ocorre durante a fabricação e baseia-se, essencialmente, na aplicação de boas práticas de fabricação (GMP, em inglês). Estas passam por preparar os cosméticos em condições estritamente assépticas e por fazer o controlo microbiológico das águas e matérias-primas, bem como certificar-se da desinfeção dos equipamentos e da qualificação dos trabalhadores. Esta estratégia é certificada pela ISO 22716:2007 - Boas Práticas de Fabricação para Cosméticos (3,9).

A estratégia secundária é utilizada para preservar os produtos cosméticos durante o armazenamento, transporte e utilização e baseia-se na preservação física, química e físico-química (3,9). A preservação física consiste na utilização de embalagens, cuja seleção depende de fatores como a forma, o tamanho, a natureza e a composição em materiais, como barreira física à contaminação microbiana tanto durante o uso como durante a distribuição do produto cosmético (3,9). A preservação físico-química passa por reduzir a atividade da água nos produtos cosméticos, diminuindo a sua disponibilidade aos microrganismos; por criar emulsões de água em óleo, já que a composição química da fase oleosa pode conferir atividade antimicrobiana; e por controlar os valores de pH numa faixa não compreendida entre os 5 e os 8 (faixa ótima para o crescimento de microrganismos) (3,9). A preservação química passa por adicionar ao produto cosmético substâncias com propriedades antimicrobianas, de origem sintética ou natural, ou por retirar proveito dos ingredientes multifuncionais, ou seja, ingredientes cuja função no produto cosmético já era bem definida adotando-se, desta forma, uma estratégia de autopreservação (3,9,10).

Os compostos autorizados, na União Europeia, para utilização como conservantes químicos sintéticos em produtos cosméticos, encontram-se listados no Anexo V “Lista dos Conservantes Autorizados nos Produtos Cosméticos” do Regulamento Europeu n.º 1223/2009, sendo que este documento, no Artigo 2.1 (l) define como conservantes “substâncias cuja finalidade principal ou exclusiva consiste em inibir o desenvolvimento de microrganismos no produto cosmético” (4). A escolha destes conservantes como sistema de preservação, para além de estar em conformidade com o regulamento, depende da eficácia antimicrobiana, da toxicidade e da compatibilidade com os ingredientes já presentes no produto cosmético, e podem ser utilizados de forma conjunta para aumentar a atividade antimicrobiana, ampliando o espectro de ação e diminuindo a resistência dos microrganismos e o risco de toxicidade (3). Só os compostos listados no referido Anexo podem ser usados com a função de conservantes em formulações cosméticas cuja fórmula qualitativa e quantitativa não dispense a adição de um sistema conservante, conforme as estratégias descritas acima para os processos de preservação física.

A preservação com produtos químicos naturais baseia-se na utilização de extratos de plantas, incluindo-se os óleos essenciais, com propriedades antimicrobianas reconhecidas e que podem ser utilizados de forma livre, microencapsulados ou em nanoestruturas (3,10). NO entanto, estes compostos quando adicionados às formulações cosméticas, à luz do Regulamento 1223/2009, terão de estar associados a uma função primária distinta da de conservação. A sua inclusão oficial no Anexo V deverá ser no futuro próximo, uma estratégia efetiva da indústria de modo a garantir a sua utilização em formulação, também por esta via.

1.1.2.1. Toxicidade dos conservantes químicos

Existe uma relação direta entre o efeito antimicrobiano de um conservante e a sua capacidade de induzir toxicidade (3). Desta forma, a utilização de conservantes pode induzir efeitos indesejáveis nos consumidores que podem aparecer logo após o primeiro contacto com o produto cosmético, caracterizados por leves irritações na pele, ou após anos de utilização do produto cosmético, que podem alterar a atividade estrogénica e induz tumores mamários (3,9,11).

A identificação da toxicidade por produtos cosméticos é conseguida pela triagem de irritações oculares, de irritação primária da pele, da sensibilidade da pele e a partir de teste à mutagenicidade (3).

O *Scientific Committee on Consumer Safety* (SCCS), bem como outras comissões europeias, realizam regularmente testes à segurança dos conservantes químicos sintéticos listados no Anexo V, que resultam tanto na edição dos limites não tóxicos já estabelecidos como na sua reclassificação, podendo alguns, inclusivamente, passar para a lista das substâncias proibidas em produtos cosméticos (Anexo II do Regulamento Europeu n.º 1223/2009 relativo aos produtos cosméticos) (3,9).

A Agência Nacional Francesa de Medicina e Segurança de Produtos de Saúde proibiu a fabricação, importação, exportação e comercialização de produtos cosméticos com cloroacetamida (3). Os parabenos, classe de conservantes mais utilizada em todo o mundo, foram alvo de testes que comprovaram que as subclasses metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno e butilparabeno têm propriedades químicas semelhantes às dos estrogênios. Ainda que esta atividade estrogénica tenha sido considerada baixa, as alterações endócrinas que podem causar no organismo e a sua potencial ligação com certos tipos de cânceres, como o da mama, levantaram muitas questões sobre a segurança da sua utilização para a saúde humana (9,11), fazendo com que a SCCS recomendasse a diminuição das concentrações do propilparabeno e do butilparabeno para utilização em cosméticos (3).

Desta forma, a eliminação recorrente de compostos conservantes da lista do Anexo V, bem como a diminuição dos limites não-tóxicos de aceitação para utilização em produtos cosméticos, tem impulsionado a indústria na procura de novas substâncias que se mostrem ativas e seguras, e que possam, por essa via, ser propostas como compostos conservantes para este tipo de produtos e, conseqüentemente, adicionadas à lista positiva do anexo de ingredientes conservantes (3,9).

Quando se pretende desenvolver ou selecionar um sistema de conservação para um produto cosmético, é necessário atender aos seguintes requisitos: (1) identificação de potencial toxicidade: potenciais efeitos tóxicos associados a avaliações pré-clínicas e clínicas; (2) avaliação da dose-resposta: relação entre a dose e o efeito; (3) exposição: utilização do produto pelo consumidor, já que a extensão, a duração e a frequência de exposição de um composto têm influência no seu nível de toxicidade; (4) caracterização do risco: perigos conhecidos de um composto no contexto de exposição humana (3).

O SCCS, responsável pela avaliação da segurança de um ingrediente cosmético, apresenta um procedimento de avaliação típico que deve ser tido em conta pelos fabricantes quando requerida a legalização de um ingrediente cosmético pela indústria europeia. Essa avaliação está compreendida em 4 elementos essenciais, detalhados no tópico 3.1 do documento “Notas de orientação para o teste de ingredientes cosméticos e avaliação da sua segurança, 10.^a revisão”, e todos os testes e diretrizes requeridas devem ser compilados num dossiê generalizado e específico para cada ingrediente cosmético, que se encontra no anexo 3 (*Appendix 3: Standard format of the opinions*) deste mesmo documento (em anexo nesta dissertação, Anexo 1) (12). No caso de ser requerida uma reavaliação ou a entrada de um ingrediente cosmético no mercado, este dossiê tem de ser preenchido para posterior avaliação por esta entidade.

1.1.2.2. Eficácia antimicrobiana do sistema de preservação cosmético

Antes do produto cosmético ser colocado no mercado, este é testado quanto à eficácia antimicrobiana do sistema de preservação, garantindo que nenhum microrganismo foi introduzido no produto durante ou após os processos de fabrico (3).

O *challenge test*, também conhecido como o teste do desafio microbiológico, é o teste universalmente utilizado para testar a eficácia conservante de produtos farmacêuticos ou cosméticos acabados. Tem como objetivo avaliar a resistência de um produto à contaminação microbiana refletindo, desta forma, a eficácia do sistema conservante e se este se adequa ao período de validade do produto, já que os agentes antimicrobianos têm de ser eficazes durante todo o ciclo de vida do produto. O teste consiste em inocular o produto com uma determinada população de um microrganismo padrão e efetuar a contagem dessa mesma população em diferentes tempos de incubação (3). Com este teste, o produto final pode ser avaliado em 3 momentos diferentes: quando recém-preparado em condições laboratoriais (1.º); após o primeiro lote de produção, imediatamente antes do embalamento (2.º); e após ser embalado no recipiente selecionado (3.º) (3). Este teste encontra-se definido em todas as farmacopeias (Europeia, Americana e Japonesa), nas diretrizes da Associação de Cosméticos, Higiene Pessoal e Fragrâncias (CTFA-M1 a CTFA-M7, em inglês), da Associação para as Nações do Sudeste Asiático (ASEAN, em inglês) e da Associação Americana de Testes e Materiais (ASTM, em inglês) na norma ISO 11930:2019 - *Cosmetics - Microbiology - Evaluation of the antimicrobial protection of a cosmetic product*, entre outros. Apesar de todas estarem harmonizadas no que diz respeito ao ensaio propriamente dito, apresentam diferentes abordagens consoante o tipo de produto que se pretende analisar, diferindo nos microrganismos utilizados para os ensaios, nos intervalos de tempo da execução do teste e nos critérios de aceitação para a eficácia antimicrobiana (3,13-15).

As farmacopeias consideram obrigatório incluir nos testes de eficácia antimicrobiana, em produtos farmacêuticos ou cosméticos, exemplares de microrganismos potencialmente patogénicos e que sejam fornecidos por reservas/bancos oficiais, como a *American Type Culture Collection* (ATCC). A farmacopeia da UE considera obrigatório incluir a *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), o *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), a *Candida albicans* (ATCC 10231) e o *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404) e as farmacopeias dos EUA e a do Japão, para além das estirpes anteriores, consideram essencial incluir ainda a *Escherichia coli* (ATCC 8739) (3,13-15). Contudo, esta seleção não se mostra suficiente para testes de eficácia antimicrobiana em produtos cosméticos e de cuidados pessoais pois abrange microrganismos específicos por deteriorar este tipo de produtos. Desta forma, e em conformidade com as diretrizes das diferentes associações (CTFA, ASEAN e ASTM) e com a ISO 11930, o escopo de microrganismos a testar em avaliações à eficácia antimicrobiana de produtos cosméticos e de cuidados pessoais deve ser amplificado e específico à finalidade do produto.

1.1.3. Antioxidantes na Cosmética

Os danos oxidativos são umas das causas primárias do envelhecimento da pele. Estes podem ter uma origem endógena, caso haja uma desregulação do sistema enzimático envolvido na normalização das concentrações de radicais livres nas células, ou extrínseca, devido à exposição a certos fatores ambientais, como à radiação ultravioleta, ao estilo de vida e à utilização de determinadas substâncias químicas ou farmacêuticas (16).

Os radicais livres são átomos ou moléculas que possuem um eletrão livre na camada orbital mais externa sendo, por isso, substâncias bastante instáveis e reativas que oxidam rapidamente biomoléculas, a fim de alcançar a sua estabilidade (16).

O oxigénio biológico, no processo de respiração celular para formar energia na forma de adenosina trifosfato (ATP) e aquando de se transformar em água, sofre várias reações de redução gerando radicais livres e moléculas reativas de oxigénio que, não apresentando nenhum eletrão livre, motivo pelo qual não se denominam de radicais livres, são bastante reativas estando na origem de processos que geram mais radicais livres. Juntos, os radicais livres e as moléculas reativas de oxigénio, são chamados de espécies reativas de oxigénio (ERO) (16).

A produção de ERO ocorre de forma natural e espontânea nas células humanas, principalmente no processo de respiração celular na mitocôndria, mas também no retículo endoplasmático e nos peroxissomos. Desta forma, as células apresentam um sistema de defesa intrínseco capaz de estabelecer um equilíbrio entre a produção e a eliminação destas espécies reativas, protegendo as células de eventuais lesões causadas pela sua acumulação. Ao sistema responsável pela eliminação das ERO é chamado de sistema de defesa antioxidante intrínseco (17).

Quando há uma desregulação do sistema de defesa antioxidante intrínseco, ou por uma produção excessiva de ERO ou por um défice da ação do sistema antioxidante, a célula entra em *stress* oxidativo. Este fenómeno é capaz de causar danos na célula através da oxidação de biomoléculas incluindo proteínas, aminoácidos, lípidos e ácidos nucleicos, e quando ocorre em células da pele pode provocar uma diminuição da sua capacidade de auto-renovação, a uma perda da elasticidade, firmeza e pigmentação da pele, e ao aumento da fragilidade da pele, fenómenos estes que se refletem no envelhecimento deste órgão (16,17).

Nesta situação, torna-se necessário um suprimento externo de antioxidantes, tanto de aplicação tópica como ao nível da dieta, capazes de repor o equilíbrio entre as ERO e o sistema antioxidante intrínseco, prevenindo a ocorrência de lesões inerentes a este desequilíbrio, ou para reparar possíveis danos já existentes (16,17).

No geral, os antioxidantes podem atuar das seguintes formas: podem prevenir a criação de ERO ou limitar o seu acesso a importantes locais biológicos; podem “absorver” energia e eletrões, extinguindo as ERO; podem atuar sobre determinadas enzimas, neutralizando ou desviando as ERO; e podem ativar ou desativar radicais livres que participam na cadeira de formação de

ERO. Desta forma, e mediante o seu modo de atuação, os antioxidantes podem ser classificados como primários, caso atuem diretamente sobre os radicais livres doando-lhes rapidamente um átomo de hidrogênio e formando uma substância mais estável, ou como secundários, caso reajam com enzimas iniciadoras da formação de ERO ou sobre o oxigênio iniciador da cadeia que as forma, retardando, pela eliminação dos iniciadores, a taxa de ocorrência da reação que forma as ERO (18).

O ácido ascórbico, as vitaminas A, C e E, os carotenoides, a coenzima Q10 e compostos polifenólicos são, habitualmente, utilizados como princípio ativo antioxidante em produtos cosméticos contra o envelhecimento da pele (16,19). Destes, alguns têm origem vegetal sendo produzidos por inúmeras plantas, provando que extratos derivados de plantas que os produzem podem ser potenciais atrativos para criar formulações cosméticas de aplicação tópica de origem natural.

1.2. Óleo Essencial

Os óleos essenciais são uma complexa mistura de compostos, resultantes do metabolismo secundário da planta que o produz, que pertencem, maioritariamente, à família dos terpenos, incluindo-se os monoterpenos, os sesquiterpenos e os diterpenos, ainda que estes em menores quantidades que os anteriores (20-22). Podem, ainda, apresentar na sua constituição terpenóides, que são compostos derivados dos terpenos, compostos fenólicos, flavonoides e outros compostos aromáticos, todos estes caracterizados por terem baixo peso molecular (21). Os metabolitos secundários são produzidos por estruturas como os plastídios presentes no citoplasma das células da planta sendo que, posteriormente, são armazenados em células secretoras, células epidérmicas, em cavidades, canais ou tricomas glandulares, presentes em diversas partes e constituintes da planta como flores, folhas, estames, sementes, raízes, frutos, entre outras (10,20-22).

Esta mistura de compostos, é líquida, lipofílica, volátil, com características aromáticas e odor característico, de coloração pouco acentuada tendo, geralmente, densidade menor que a da água, sendo esta a razão pela qual apresenta melhor solubilidade em compostos orgânicos (10,20,21). Nela, geralmente, são identificados sempre dois ou três compostos maioritários em concentrações entre 20 % a 70 % mais elevadas que os restantes constituintes (5,9). O número de constituintes do óleo essencial pode ir até cem compostos diferentes, sendo que estes variam em composição e proporção dependendo da idade, do órgão e do ciclo de vida da planta, bem como do tipo de solo onde esta cresce, das condições climáticas, sazonais e ambientais, método de destilação, entre outros (21,23).

Embora se possa pensar que os compostos maioritários determinam a atividade biológica do óleo essencial, a verdade é que estes não podem ser vistos de forma individual. Os restantes compostos, ditos de minoritários, conferem-lhe várias características como o odor, a cor, a densidade, a textura, a capacidade de penetração nas células e de atravessar as membranas, velocidade de absorção, entre outras que, direta ou indiretamente, influenciam a bioatividade do mesmo. Desta forma, apesar de existirem compostos ativos responsáveis por uma dada atividade, os compostos inativos determinam a bioatividade do mesmo (21). Assim, para análises biológicas, é mais correto considerar o óleo essencial como um todo, já que o efeito sinérgico se mostra mais significativo para a determinação da bioatividade do que os compostos maioritários de forma individual (21).

Os óleos essenciais são extraídos, de plantas aromáticas que se localizam, maioritariamente, em zonas temperadas e tropicais características do clima mediterrâneo e tropical, e representam uma parte importante das suas farmacopeias (21).

A Organização Internacional de Padronização de Óleos Essenciais apenas considera como óleo essencial o produto obtido exclusivamente por hidrodestilação ou destilação a vapor a partir de constituintes da planta (10).

Um óleo essencial pode ser nomeado pelo nome e/ou espécie comum da planta do qual foi extraído e quando somente o nome comum é apresentado, entende-se que o óleo essencial pode ser obtido de várias espécies da mesma planta (10).

A cromatografia gasosa é a técnica habitualmente utilizada para analisar a composição dos óleos essenciais, descriminando quais os compostos e em que percentagem em relação ao total se encontram, surgindo, muitas vezes, associada à espectrofotometria de massa, do inglês *Gas Chromatography - Mass Spectrometry (GC/MS)* (18).

1.2.1. Aplicações Tradicionais e Atuais Dos Óleos Essenciais

A utilização dos óleos essenciais remonta aos tempos antigos da história da humanidade, em que os seus aromas doces e delicados se mostravam bastante atrativos para as mulheres. No Egipto antigo, e tendo como exemplo a rainha Cleópatra, as mulheres utilizavam os óleos essenciais extraídos de flores para criar fragâncias de forma a melhorar a sua atratividade e aumentar a sua feminilidade. Mais tarde, estas práticas passam a ser adotadas também pelas mulheres gregas e romanas que os utilizavam como infusões em banhos de relaxamento físico e mental (10).

Há mais de mil anos que as plantas aromáticas e os seus óleos essenciais são utilizados para fins terapêuticos, eram utilizados para aliviar a dor, cuidar da pele, aliviar a tensão e a fadiga, revigorar o corpo e produzir uma sensação de relaxamento, sendo adicionados a banhos,

massajados na pele, inalados diretamente ou difundidos para perfumar uma determinada área (22).

Nos dias de hoje, problemas como a resistência de certos microrganismos a alguns medicamentos e conservantes convencionais, o aumento de populações imunocomprometidas e as limitações dos antibióticos disponíveis, motivaram os consumidores a procurar terapias complementares e alternativas, pressionando a indústria farmacêutica a procurar sistemas que acompanhem estas necessidades. Aliada a esta problemática surge, ainda, a crescente procura da sociedade por produtos de origem natural que valorizem as potencialidades da natureza, dando favoritismo a produtos “amigos do ambiente”. Desta forma, os óleos essenciais, cuja utilização já vinha desde a antiguidade, voltam como potencial resolução (10).

Os óleos essenciais apresentam variadas atividades biológicas tais como: anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica, anti-viral, antioxidantes, anticancerígena, anti-reumática, anti-tússica, expectorante, imunomoduladora, sedativa, e quando, absorvidos por inalação, têm capacidade de alterar a memória e o humor, o que lhes conferem várias propriedades medicinais (21,22).

Contudo, é na área da cosmética que eles se mostram bastante promissores apresentando não só um importante papel na fragância do produto, sendo utilizados em perfumes, formulações para a pele e em produtos capilares, mas também na conservação dos mesmos quando o óleo em questão apresenta propriedades antimicrobianas e antioxidantes (10,22). Inserida na área da cosmética surge uma outra área em crescente evolução, a cosmacêutica, que utiliza as propriedades cosméticas dos óleos essenciais aliado aos seus poderes farmacêuticos (10). Estes produtos têm ganhado popularidade ao longo dos anos, estando presentes em diversos tipos de formulações e apresentando diferentes finalidades. Alguns óleos essenciais são utilizados para combater o envelhecimento da pele ou para a reparar, após a exposição solar e contra danos causados pelo acne; para limpeza do cabelo e estimular o crescimento do mesmo quando aplicados em champôs; para proteção e limpeza dos dentes quanto aplicados em dentríficos; para melhorar o odor quando aplicados em desodorizantes, perfumes e anti-tranpirantes, entre outras aplicações (10).

Apenas é considerado como ingrediente cosmético de origem natural aquele que é obtido apenas de plantas, animais, microrganismos ou minerais, a partir de processos físicos, de reações de fermentação que ocorrem na natureza e que originam moléculas que ocorrem na natureza, ou de outros processos de preparação incluindo os tradicionais (como exemplo a extração que utiliza determinados solventes aprovados) sem modificação química intencional (24).

Sendo assim, os óleos essenciais surgem como potenciais produtos de origem natural cujas propriedades polivalentes que demonstram os tornam bastante atrativos para as indústrias cosmética e farmacêutica, nomeadamente, no desenvolvimento de produtos de origem natural

e biodegradável, que sejam igualmente eficazes para colmatar as atuais necessidades dos consumidores.

A volatilidade e a lipofilia características dos óleos essenciais, em determinadas condições, podem levar a uma redução das suas atividades, já que após inclusão na formulação cosmética podem “perder-se” ao longo das variadas utilizações. Por outro lado, e mediante a concentração necessária para que se tornem eficazes, podem apresentar de forma excessiva os odores que lhes são característicos, cuja utilização acaba por se desadequar em certas formulações cosméticas. Podem, ainda, causar alergias dermatológicas e são específicos contra determinados microrganismos, por essa razão, uma utilização conjunta de diversos tipos de óleos essenciais pode ser uma boa opção para garantir proteção contra uma vasta variedade de microrganismo e, utilizando pequenas quantidades de cada tipo, diminuir a possibilidade de desenvolver dermatites de contacto (9).

1.2.2. Óleos Essenciais como Agentes Antimicrobianos

A natureza oferece um variado e amplo espectro de mecanismos de defesa, onde se incluem substâncias e compostos produzidos por certas plantas, cuja principal função é protegê-las dos organismos invasores. Os óleos essenciais desempenham um importante papel na proteção da planta como agente antibacteriano, antifúngico, anti-viral e inseticida (21). Dadas estas características, muitos têm sido os estudos que procuram analisar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais e estudar a sua aplicabilidade na área da cosmética, nomeadamente como substitutos dos conservantes químicos tradicionais, listados no Anexo V do Regulamento Europeu n.º 1223/2009 (9).

A determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) é o ensaio *in vitro* mais frequentemente utilizado quando se pretende analisar a atividade antimicrobiana de um ingrediente, incluindo-se o óleo essencial, avaliando a potencialidade deste ser utilizado como conservante em produtos cosméticos ou farmacêuticos.

A CMI é definida como a concentração mínima de um agente antimicrobiano que inibe o crescimento de um microrganismo isolado. É determinada inoculando um microrganismo padrão com diferentes concentrações (microdiluições em meio líquido) do agente cuja atividade antimicrobiana se pretende analisar e é utilizado, principalmente, como ferramenta de pesquisa *in vitro* de potenciais conservantes. Os seus procedimentos encontram-se definidos em diferentes normas, publicadas pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS), específicas para o microrganismo em teste ((25-27)). Quando determinada a CMI é possível, ainda, determinar a Concentração Mínima Letal (CML) do agente antimicrobiano, ou seja, a concentração para a qual ocorre morte do microrganismo (28).

O leque de microrganismos a testar deve estar em conformidade com as estirpes referenciadas nos testes de eficácia conservante (*challenge test*), realizados a produtos farmacêuticos e

cosméticos, e incluir outros microrganismos considerados pertinentes para a aplicação do produto final. No caso de a sua aplicação ser como agentes antimicrobianos em produtos cosméticos de aplicação tópica, devem ser considerados, neste teste, os patogénicos relevantes em infeções da pele.

Ainda que com este teste seja demonstrada a potencialidade conservante do agente antimicrobiano, esta apenas é comprovada quando incluído no produto acabado e após este ser analisado quanto à sua eficácia conservante (3).

1.2.2.1. Mecanismo de ação antimicrobiana do óleo essencial

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais depende da sua constituição sendo que esta, por sua vez, depende de fatores como as condições sobre as quais a planta cresce ou dos métodos a partir dos quais o óleo é extraído. Desta forma, e como o óleo essencial é visto como uma complexa mistura de compostos, uma análise individual da atividade antimicrobiana de cada composto não se torna fácil, pelo que esta é feita consoante a estrutura e classe química dos próprios compostos (29).

Os terpenos, compostos maioritários dos óleos essenciais, quando estudados de forma individual não demonstram atividade antimicrobiana relevante, no entanto, os terpenóides, que derivam destes compostos por modificações bioquímicas, apresentam atividade antimicrobiana em testes individuais realizados *in vitro*. Estas modificações químicas, realizadas por determinadas enzimas, adicionam moléculas de oxigénio e movem ou removem grupos metilo, fazendo surgir grupos hidroxilo e eletrões livres na estrutura destes compostos. A presença destes grupos funcionais é responsável pela atividade antimicrobiana demonstrada por estes compostos químicos (29).

Os compostos fenólicos são outro exemplo de compostos presentes, ainda que em concentrações não tão elevadas, nos óleos essenciais e que são caracterizados por apresentarem na sua constituição um grupo hidroxilo (23).

Apesar de existirem diversos mecanismos que explicam a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais, o que parece mais aceite pela comunidade científica é a sua capacidade de romper e de permeabilizar as membranas celulares dos microrganismos, por apresentarem na sua composição compostos com grupos funcionais, como o grupo hidroxilo, capazes de alterar as características estruturais e funcionais destas membranas (23,29,30). Desta forma, a permeabilização é capaz de iniciar uma cascata de reações que culminam na morte celular. A perda de iões, redução do potencial de membrana, colapso das bombas de protões e depleção da *pool* de ATP, são alguns fenómenos responsáveis pela perda da integridade destas estruturas celulares, levando à perda de macromoléculas e à lise celular. Alguns compostos podem, ainda, inativar enzimas integradas à membrana celular, tais como enzimas da via respiratória, comprometendo as suas funções (23,29-31).

Têm sido, ainda, desenvolvidas investigações que procuram explicar o mecanismo de defesa das bactérias às substâncias nocivas, tendo sido provado que bactérias com uma bomba de efluxo destas substâncias, na forma mutada se mostraram mais suscetíveis do que aquelas que a apresentam na sua forma ativa (23).

Ainda assim, esta é uma área ainda pouco conhecida e que tem merecido, ao longo do tempo, especial destaque nas investigações relacionadas com a aplicabilidade e o modo de ação dos óleos essenciais (31).

1.2.2.2. Toxicidade dos óleos essenciais

Ingredientes naturais, como os óleos essenciais, têm sido utilizados para o tratamento de distúrbios dermatológicos como a inflamação, acne, psoríase e dermatite atópica (22). Geralmente, e por terem uma origem natural, é-lhes muitas vezes conotado o sinónimo de “segurança”, no entanto diversos extratos oriundos de plantas têm efeitos fitoquímicos sobre o organismo humano podendo causar efeitos biológicos aos quais podem estar associados fenómenos de irritação cutânea, sensibilização de contacto ou reações alérgicas (21,23).

A citotoxicidade, ou seja, o estudo da toxicidade celular, é o ensaio *in vitro* frequentemente utilizado quando se pretende identificar o potencial citotóxico de um ingrediente, incluindo-se o óleo essencial, avaliando a potencialidade de este ser utilizado em produtos cosméticos ou farmacêuticos de aplicação tópica. Este teste consiste na estimulação direta de camadas de células com diversas concentrações do agente, cujo perfil citotóxico se pretende analisar. As células são selecionadas quanto à sua prevalência nas camadas da pele, incluindo-se, desta forma, linhas celulares como os fibroblastos e os queratinócitos, representativos das camadas epidérmica e dérmica, respetivamente (23,31).

Apesar dos testes citotóxicos realizados *in vitro* poderem dar uma noção do nível de toxicidade do óleo essencial, outros fatores como a reabsorção, o transporte dos compostos ativos, a biotransformação, as diferentes estruturas da pele, bem como outros fatores biológicos, não estão a ser contemplados nestes estudos pelo que estes valores poderão sobrestimar a toxicidade *in vivo* e as concentrações efetivas no local de ação. Os efeitos secundários também têm de ser considerados no cálculo da dosagem máxima que pode ser administrada sem efeitos secundário, como a irritação local na pele e nas membranas mucosas, reações alérgicas e dermatite de contacto (31).

O carácter lipofílico, característico dos óleos essenciais, confere-lhe a capacidade de atravessar as membranas citoplasmáticas de células e dos seus organelos através da permeabilização dos fosfolípidos, dos polissacarídeos e dos ácidos gordos. Uma vez no citoplasma, os óleos essenciais provocam a despolarização das membranas mitocondriais, levando a uma diminuição do seu potencial por perda de iões, à desregulação do ciclo de alguns canais iónicos, à diminuição do gradiente de pH, ao colapso da bomba de protões e consequente depleção da *pool* de ATP.

Desta forma, a membrana torna-se anormalmente permeável resultando numa perda de radicais, citocromo C, iões e proteínas, causando *stress* oxidativo e falhas bioenergéticas, que culminam na morte celular por apoptose e necrose (21).

Desta forma, e para além de ser necessário traçar o perfil toxicológico do óleo essencial antes da sua utilização em formulações cosméticas de aplicação tópica, é importante entender que essa mesma toxicidade pode variar entre óleos essenciais obtidos da mesma espécie de planta aromática, mediante as condições sobre as quais a planta cresce e sobre as quais ocorre a colheita do óleo essencial (32).

1.2.3. Óleos Essenciais como Agentes Antioxidantes

Muitos estudos têm demonstrado que componentes vegetais como frutas, ervas e especiarias contêm moléculas antioxidantes, como os carotenóides, os retinóides, os tocoferóis, o ácido ascórbico, o ácido fenólico, os flavonoides e os polifenóis (21). Desta forma, a origem natural dos óleos essenciais, fez aumentar as investigações à sua atividade antioxidante (17,18,21).

Compostos fenólicos e os seus derivados, tais como os taninos e os flavonoides, extraídos de plantas, demonstraram ter atividade antioxidante quanto aplicados na pele (16,19,22) e, embora os óleos essenciais sejam constituídos maioritariamente por compostos pertencentes à família dos terpenos, a quantidade de compostos fenólicos que os constituem confere-lhe características antioxidantes que podem ser justificadas por um efeito sinérgico entre os compostos (17).

Assim, um dos testes *in vitro* possíveis de realizar para analisar o potencial antioxidante de um óleo essencial é o ensaio da redução do DPPH. O DPPH é um radical livre de coloração roxa (que absorve aos 517 nm) que, e caso o óleo apresente capacidade antioxidante, será reduzido passando a apresentar coloração amarela. É um teste simples, rápido, sensível e eficaz que requer pequenas quantidades de óleo essencial por ensaio, o que o torna bastante rentável (18,33-36). Dada a sua sensibilidade alguns autores consideram suficiente utilizar apenas este método para avaliar a atividade antioxidante, estando esta decisão muitas vezes associada aos bons valores de atividade antioxidante encontrados para um determinado óleo essencial que estabelecem correspondência com a sua composição, desciminada por técnicas como a cromatografia gasosa, responsáveis por tal atividade (18).

Desta forma, os óleos essenciais mostram-se como potenciais agentes antioxidantes naturais despertando o interesse das indústrias farmacêutica e cosmética para a criação de produtos de origem natural, tão apreciados pela sociedade atual, que funcionem não só para combater a oxidação natural a que o produto está sujeito, como para prevenir o *stress* oxidativo associado ao envelhecimento da pele (17,18).

1.2.4. Hidrolato: Um subproduto da destilação dos Óleos Essenciais

Durante o processo de obtenção do óleo essencial é possível obter um outro produto denominado de hidrolato, hidrossol, ou, comumente, de água aromática ou floral que, nada mais é do que a solução aquosa resultante da condensação da mistura óleo essencial e vapor de água após a destilação (20,37,38).

Em plantas com um baixo conteúdo em óleos essenciais, este apresenta-se como o único produto com valor, resultante do referido processo de destilação, e tem um odor mais subtil que o óleo essencial, que o originou e normalmente é um subproduto rico em compostos terpénicos mais polares, como os álcoois e as cetonas (37).

O seu baixo conteúdo em terpenos e sesquiterpenos torna-os bastante tolerados pela pele, não causando irritação da mesma, o que, juntamente com as características aromáticas que tem, o torna um valioso produto cosmético, possível de utilizar em tónicos corporais e faciais, loções, *afterhaves* e como componente em produtos de terapia e rejuvenescimento facial (37). Podem, ainda, ser utilizados na indústria alimentar para realçar o sabor dos alimentos e bebidas, e na área da aromaterapia, em ambientadores ou em detergentes (37).

Tal como o óleo essencial que o originou, este demonstra ter as mesmas propriedades biológicas, ainda que com efeito mais reduzido (37).

1.3. *Cistus ladanifer*

1.3.1. Taxonomia e Filogenia

A ordem Malvales, do reino vegetal inclui diversas famílias, entre as quais se destaca a Cistaceae. A família Cistaceae compreende oito géneros, cinco dos quais se encontram representados na região mediterrânea: *Cistus*, *Fumana*, *Halimium*, *Helianthemum*, e *Xolantha*; e cerca de cento e oitenta espécies (39-41).

O género *Cistus* é dividido em três subgéneros, o *Cistus*, constituído por quatro espécies, o *Halimioides*, constituído por duas e o *Leucocistus*, constituído por oito espécies, onde se inclui a espécie *Cistus ladanifer* (39,41).

A *Cistus ladanifer* apresenta, por sua vez, três subespécies a *C. ladanifer* subsp. *africanus*, a *C. ladanifer* subsp. *ladanifer* e a *C. ladanifer* subsp. *sulcatus* (42).

Esta organização taxonómica foi primeiramente feita com base em observações fenotípicas de características vegetativas (forma de crescimento, número de nervuras, cor, tricomas das folhas e estames, arranjo foliar e fixação) e de características reprodutivas (forma, número de

sépalas e pétalas, cor das flores, comprimento do estilo, fertilidade do estame e número de frutos). No entanto e mais recentemente, esta tem vindo a ser confirmada, reorganizada e reconstruída através de estudos filogenéticos comparativos das diferentes taxas, utilizando marcadores de DNA, tanto nuclear como de organelos, que se apresenta estruturalmente estável e cuja hereditariedade é maternal (39-43).

Estes estudos permitiram, ainda, datar a origem da planta *Cistus ladanifer* e a divergência das suas subespécies na altura do Pleistoceno Superior aquando da abertura do Estreito de Gibraltar e do início do clima mediterrâneo. Através da análise de sequências específicas de DNA de *C. ladanifer* colhidas na Europa e no norte de África e a partir de análises filogenéticas concluíram que existia uma correlação entre as sequências encontradas nos dois continentes, o que sugere que ambos farão parte de uma mesma linhagem desta planta. Inferiram, ainda, que terão existido dois eventos intercontinentais de colonização após a abertura do Estreito de Gibraltar (c. 5 Ma), o que sustenta a hipótese de dispersão de longa distância (40,41).

Tabela 1 - Organização taxonómica da planta *Cistus ladanifer*.

Reino	Plantae
Filo	Angiospermofita
Classe	Magnoliopsida
Ordem	Malvales
Família	Cistaceae
Género	<i>Cistus</i>
Sub-género	<i>Leucocistus</i>
Espécie	<i>C. ladanifer</i>

1.3.2. Distribuição Geográfica

A família Cistaceae distribui-se maioritariamente pelo Hemisfério Norte em regiões temperadas e subtropicais, não necessitando de solos muito ricos para crescerem. Cinco dos seus géneros são nativos da área mediterrânea (*Cistus*, *Fumana*, *Halimium*, *Helianthemum* e *Tuberaria*) e os restantes três habitam exclusivamente em regiões da América (*Croanthemum*, *Hudsonia* e *Lechea*) (39,40).

As plantas do género *Cistus* cobrem, então, maioritariamente a região ocidental do Mediterrâneo, com principal foco no estreito de Gibraltar (norte de África e sul da Europa), nas Ilhas Canárias e na Madeira (40,43). Das vinte e uma espécies deste género, doze encontram-se na Península Ibérica e as restantes distribuem-se entre a Península Ibérica, Marrocos, Itália, Argélia e França. Na região oriental do Mediterrâneo também é possível encontrar espécies do género *Cistus*, no entanto em número muito inferior (43).

A espécie *Cistus ladanifer*, habitualmente denominada de esteva, aparece predominantemente em regiões do sudoeste da Península Ibérica, que se encontram a 1500 m acima do nível do mar, abrangendo o Sul de França até ao norte de Marrocos e Argélia (40,41). Podem formar densas populações que integram solos ácidos, pobres e siliciosos com xisto, granito ou arenito e, ainda, solos vulcânicos. A subespécie *ladanifer* distribui-se pela Península Ibérica, norte de África, sul de França e em algumas zonas das Ilhas Canárias, a subespécie *sulcatus* é endémica do sudoeste de Portugal (região do Algarve) e a *africanus* está presente no sul de Espanha (Cádiz, Málaga) e no norte de África (40,41).

1.3.3. Morfologia e Biologia Reprodutiva

As plantas do género *Cistus*, bem como os restantes géneros da família Cistaceae, são hermafroditas e actinomorfas (39). São pequenos arbustos lenhosos com uma haste reta com ramificações e podem atingir entre um a dois metros de altura quando adultas (41,43).

As flores das vinte e uma espécies de *Cistus*, divididas pelos três subgéneros, apresentam entre três a cinco pétalas e formam duas linhagens bem definidas quanto à sua cor. Os subgéneros *Leucocistus* e *Halimioides* formam o grupo das pétalas brancas num total de doze espécies e o subgénero *Cistus* forma o grupo das pétalas rosa a roxas e contém nove espécies (40,42,43).

As folhas desta família são onduladas, simples e indivisíveis e crescem de forma oposta ou alterna apresentando glândulas epidérmicas na sua superfície, os tricomas (43,44). Existem dois tipos de tricomas encontrados nas folhas de *Cistus*: os não secretores, chamados tectores (não glandulares), constituídos por estruturas unicelulares e que existem apenas na superfície inferior da folha; e secretores, chamados de glandulares, constituídos por estruturas multicelulares compostas por pequenas cabeças curtas que armazenam e secretam um exsudato óleo-resinoso, pegajoso e perfumado, o lábdano, que lhes confere um distintivo aroma (41,43,44). Esta resina é também secretada por hastes fotossintéticas sendo que a quantidade excretada é maior em folhas jovens, seguindo-se nestas hastes e, por fim, menor em folhas maduras (41). A sua produção varia, também, sazonalmente, aumentando com o aumento da temperatura, e diariamente, apresentando máximos de produção ao meio dia (41). De todas as *Cistus*, a *C. ladanifer* é das que apresenta uma maior produção de lábdano cobrindo quase na totalidade toda a superfície da folha e fazendo com que, muitas vezes, os tricomas se encontrem embebidos nesta resina (44). Esta característica fê-la destacar-se desde a antiguidade, aparecendo citada na bíblia como uma “goma” (44).

A *C. ladanifer* é uma espécie autoincompatível, com mecanismos gametofíticos de incompatibilidade que a tornam um *outcrosser* obrigatório, e de polinização predominantemente entomófila que, em adulta, pode atingir dois metros de altura (41,45). É um arbusto muito viscoso e ereto, com raízes densas e um sistema de rebentos (41).

As suas folhas são verdes e lanceoladas, com uma superfície superior glabra e uma superfície inferior coberta por um tegumento branco (41). A morfologia destas e da cápsula são normalmente, utilizadas para identificar as suas três subespécies (40). A *africanus* tem folhas pecioladas e lanceoladas com poucos nervos aparentes e a sua cápsula pode ser dividida entre seis a dez válvulas. Já as subespécies *ladanifer* e *sulcatus* têm folhas sésseis, sendo que na primeira as folhas apresentam nervuras visíveis e uma cápsula que se divide entre nove a dez válvulas, e na segunda as folhas elípticas têm nervuras muito visíveis e uma cápsula que pode ser dividida entre oito a nove compartimentos (41).

A *C. ladanifer* é conhecida por apresentar as maiores e mais vistosas flores do género *Cistus* podendo o seu tamanho variar entre os cinco e os dez centímetros de diâmetro, sendo constituídas por três a cinco sépalas ovais com pêlos verde-amarelados e por cinco pétalas que podem ser totalmente brancas ou ter uma mancha avermelhada na base de cada uma (41,45). Estas flores apresentam, ainda, pedúnculos curtos, entre os cinco e os dezasseis centímetros, cobertos por pêlos peltatos de cor amarela (41), um androceu constituído por numerosos estames férteis e desiguais e um gineceu formado por um único ovário com seis a doze carpelos e por um estilete reto, longo e discreto, com um único estigma, séssil, grande e discoide, com cinco a doze lóbulos (39,41,43).

Na altura da Primavera, produz entre uma a três flores efêmeras de morfologia aberta com um elevado número de óvulos por flor. Estas características levam a uma produção considerável de pólen (mais de setecentos mil grãos de pólen por flor) e de néctar promovendo, assim, o sucesso de polinização por parte de variadas espécies de insetos, tais como, besouros (*Coleoptera*), abelhas (*Hymenoptera*) e moscas (*Diptera*) (40,45,46).

Os seus frutos são cápsulas globulares lenhificadas, constituídas entre seis a doze válvulas que abrem no Verão e fazem cair cerca de 80 % das suas sementes junto da planta mãe (41,45). A libertação das sementes começa no meio do Verão e prolonga-se por mais oito ou dez meses (41). Cada uma das cápsulas produz entre quinhentas a mil sementes poliédricas de 0,5 mm a 1 mm de tamanho e com 0,27 mg de peso, características estas que facilitam a sua penetração no solo e que levam à formação de “bancos de sementes” que lhes oferecem proteção contra

condições desfavoráveis (39,41,45). As sementes são diploides com um número de cromossomas $n=9$ ($2n=18$) (41,45).



Figura 1 - Fotografias da planta *Cistus ladanifer* (Delgado F. 2019).

1.3.4. Tipos de Extratos

O l abdano e o óleo essencial são dois produtos obtidos, por m etodos específicos e distintos da esteva. O l abdano   libertado de estruturas fotossintéticas, como as folhas, e ocorre naturalmente em plantas aromáticas intactas, sendo obtido através da fervura do material da planta que o produz (41). Já o óleo essencial   obtido por hidrodestila o ou destila o por arrastamento de vapor dos constituintes da planta, como folhas, ramos, caules e raízes (41,47,48). Do processo de obten o do óleo essencial pode, ainda, ser obtido um outro extrato, o hidrolato (20,37,38).

Do l abdano podem, ainda, surgir outros extratos quando se pretende determinar a sua composi o química. Os constituintes da planta que o libertam, ou ele próprio, podem ser analisados através da aplica o de diversos solventes que, seletivamente, irão extrair compostos para os quais terão afinidade química. Pode também ser obtido óleo através da destila o do l abdano. Estes extratos são considerados derivados do l abdano (41).

Dos diversos constituintes da planta, e após estes sofrerem um processo de moagem, podem ser originados os chamados bioextratos. Estes são obtidos por técnicas de extração com determinados solventes orgânicos e por técnicas diferentes das utilizadas para a obtenção de óleos essenciais. Por norma, estes extratos são denominados de bioextratos e são referenciados acompanhados do nome do solvente orgânico utilizado para a sua extração (41).

Dada a diversidade de métodos de extração e dos solventes utilizados nos mesmos, o perfil químico dos extratos difere não só no número de moléculas que os constituem, mas também na estereoquímica das mesmas. Desta forma, para além de ser possível escolher o tipo de extração mediante o propósito de utilização, através da seleção dos solventes de extração, quando é requerida uma análise comparativa entre extratos ou entre óleo essenciais, deve ser assegurado que não há alterações nos padrões de extração, sendo que a parte da planta de onde é extraído, o solo onde ela cresce bem como o clima que a envolve, a sua idade, o seu estágio e o seu ciclo vegetativo deverão ser considerados e não diferir entre plantas em análise (21).

O óleo essencial, de todos os extratos de esteva, é aquele que desperta maior interesse por parte da comunidade científica devido às suas propriedades, desta forma, é o mais estudado de todos os extratos (41).

1.3.5. Caracterização Química dos Extratos

O lábdano mostrou ser constituído maioritariamente por compostos pertencentes à família dos terpenos como os monoterpenos, os sesquiterpenos e os diterpenos (sendo que estes se apresentam em quantidade ligeiramente inferior aos anteriores), compostos fenólicos e flavonoides (41,49-51). Outra característica de importante relevância neste extrato é a composição em norisoprenos, compostos responsáveis pelo odor (41).

Aquando dos processos de hidrodestilação, de destilação por arrastamento de vapor ou de destilação a seco, os compostos menos voláteis como os diterpenos, os norisoprenos, os compostos fenólicos e flavonoides, são perdidos ou parcialmente perdidos acabando por surgir em menores quantidades nos óleos essenciais (41). Desta forma, os óleos essenciais apresentam maioritariamente compostos pertencentes à família dos terpenos, tais como os monoterpenos e os sesquiterpenos (28,41,47,52-57).

Bioextratos são constituídos maioritariamente por compostos fenólicos e flavonoides, extraídos mediante os solventes orgânicos utilizados para tal (41,58-60).

1.3.5.1. Família dos terpenos

Os terpenos são metabolitos secundários libertados por plantas aromáticas como a *Cistus ladanifer*. Estes agrupam-se em classes, estrutural e funcionalmente, diferentes que resultam

da combinação de várias unidades de 5 carbonos base, denominadas de isopreno (21). Os terpenos que surgem maioritariamente são os monoterpenos (C₁₀) e os sesquiterpenos (C₁₅), no entanto, os diterpenos (C₂₀) também costumam surgir (21).

Os monoterpenos surgem como os compostos maioritários presentes nos óleos essenciais, representando cerca de 90 % da constituição total, e são formados por duas unidades de isopreno (21). Tendo em consideração a *Cistus ladanifer*, o α -pineno, o canfeno e o pinocarveol são os compostos que surgem em maior percentagem no referido extrato (47,49,52,54,56,61,62).

Seguindo os anteriores surge o viridiflorol como o sesquiterpeno maioritário (47,52,56,61,62).

Os diterpenos são maioritários no lábano mas raros em óleos essenciais, já que a sua baixa volatilidade não permite a sua destilação, assim, o 6-acetoxy-7-oxo-8-labden-15-oic acid, o 7-oxo-8-labden-15-oic acid e o oxocativic acid surgem como os compostos maioritários desta classe. Surgem, ainda, outros designados por *labdane type*, estando alguns detalhados na tabela 2 (49-51). A produção de diterpenos varia sazonalmente, o que sugere que a sua síntese está dependente de fatores ambientais como a temperatura e a humidade (49).

O composto 2,2,6-trimethylcyclohexanone é mencionado (47,50,52,53,61-63) como sendo o composto que, embora não seja maioritário na constituição dos extratos de *Cistus ladanifer*, é o principal responsável pelo odor característico que estes apresentam, pertencendo também a esta família.

Na tabela 2, estão listados os compostos mais representativos quando o perfil de extratos de *Cistus ladanifer*, em compostos pertencentes à família dos terpenos, é realizado.

Tabela 2 - Principais compostos da família dos terpenos presentes em análises de caracterização química de extratos de *Cistus ladanifer*. Tabela adaptada de [41]. O nome dos compostos está em língua inglesa para não confundir a tradução literária dos mesmos.

Família dos terpenos	Não oxigenados	Oxigenados
Monoterpenos	α -pinene	Pinocarveol
	β -pinene	Pinocarvone
	Camphene	Myrtenol
	Limonene	Mirtenal
	p-cymene	Borneol
	γ -terpinene	Bornyl acetate
		Terpnen-4-ol
		Linalool
		Camphor
		α -terpineol
Sesquiterpenos	δ -cadineno	Viridiflorol
	Aromadendreno	Ledol
	Viridiflorene	
Diterpenos		Labd-14-ene-16,18-diol
		Labd-14-ene-8,13-diol
		Labda-8(20),13(16),14-triene
		Labda-8,14-dienoic acid
		Labd-12-ene-15,18-diol
		16-kaurene
		Labda-7,8-dienoic acid
		6-oxo-cativic acid
		Labdanoic acid
		Labdenoic acid
Norisopreno	-	2,2,6-trimethylcyclohexanone

1.3.5.2. Flavonoides e Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos, bem como outros compostos aromáticos, constituem outro tipo de metabolitos secundários libertados por esta planta. Estes, podem ir desde simples moléculas como os ácidos fenólicos, os flavonoides e os benzenoides, a moléculas bem mais complexas e compostos altamente polimerizados como as lenhinas, as melaninas e os taninos (34).

Estudos realizados ao lábdano, e que procuraram caracterizá-lo quanto à composição em flavonoides, demonstraram que este é constituído, em maior ou menor quantidade, pelos

seguintes compostos: kaempferol, kaempferol-3-(0)methyl, kaempferol-3,7-di(0)methyl, kaempferol-3,4'-di(0)methyl, kaempferol-3,7,4'-tri(0)methyl, apigenin, apigenin-4'-(0)methyl, apigenin-7-(0)methyl e apigenin-7,4'-di(0)methyl (51,64-66).

Já estudos que focam a caracterização de óleos essenciais, principalmente extraídos de partes aéreas da planta, mostram que estes apresentam na sua constituição não só os compostos flavonoides presentes no exsudado, como também ácidos fenólicos e seus derivados (gallic acid, gentisoyl glucoside, glucogallin, gentisoil glucoside, vanillic acid, ellagic acid, punicalagins, punicalin, ellagic acid-7-xyloside, methylated ellagic acid-7-xyloside, ellagic acid, methylated ellagic acid, punicalagin-gallate, hexahydroxydiphenoyl-glucose) e outro tipo de flavonoides (gallocatechin, epigallocatechin, quercetin-3-O-glucoside, quercetin-3-O-pentosides, quercetin-O-hexoside-O-hexoside, kaempferol-0-hexoside-o-hexoside, kaempferol-o-rutinoside, kaempferol dimethylether aglycone, kaempferol-dimethylether hexoside) (67-70).

Nas tabelas 3 e 4, estão listados os compostos que mais surgem na bibliografia quando o perfil de extratos de *Cistus ladanifer*, em compostos fenólicos e flavonoides, é realizado.

Tabela 3 - Principais compostos flavonoides presentes em análises de caracterização química de extratos de *Cistus ladanifer*. O nome dos compostos está em língua inglesa para não confundir a tradução literária dos mesmos.

Flavonoides	Compostos
Apigenin	Apigenin-4'-(0)methyl
	Apigenin-7-(0)methyl
	Apigenin-7,4'-di(0)methyl
	Apigenin diglucoside
Kaempferol	Kaempferol-3-(0)methyl
	Kempferol-3,4'-di(0)methyl
	Kaempferol-3,7-di(0)methyl
	Kaempferol-3,7,4'-tri(0)methyl

Tabela 4 - Principais compostos fenólicos presentes em análises de caracterização química de extratos de *Cistus ladanifer*. O nome dos compostos está em língua inglesa para não confundir a tradução literária dos mesmos.

Compostos fenólicos	Compostos
Elagitaninos	Punicalagin
	Punicalin
	Punicalagin-gallate
	Hexahydroxydiphenoyl-glucose
Taninos	Gallic acid

1.3.6. Atividades Biológicas dos Extratos

Diversos são os metabolitos secundários produzidos pela planta *Cistus ladanifer*, agrupando-se eles nas três famílias anteriormente apresentadas. Estudos feitos à análise química dos extratos desta planta, para além de procurarem caracterizá-los quimicamente, procuram, também, estudá-los quanto às suas atividades biológicas.

Este ponto do trabalho procura clarificar quais os compostos responsáveis por tais atividades.

1.3.6.1. Atividade Antimicrobiana

Os óleos essenciais de *Cistus ladanifer* são constituídos por compostos terpenóides, maioritariamente mono e sesquiterpenos. Estudos feitos mostram que estes extratos apresentam atividade antimicrobiana contra bactérias *Gram* negativas (*Staphylococcus aureus*), bactérias *Gram* positivas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Sterptococcus pneumonia*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*), leveduras e fungos (*Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Verticillium albo-atrum*, *Mucor racemosus*) (28,50,71).

Greche *et al.* (2009), para além de analisarem o óleo essencial, analisaram, ainda, três tipos de extratos de lábdano: o resinoide, extraído com etanol diretamente do exsudado; o concreto, um extrato de hexano direto de toda a planta; e o absoluto, preparado a partir do concreto por extração com etanol. Estes mostraram ser constituídos maioritariamente por diterpenos do tipo lábdano e flavonoides e mostraram ter atividade antimicrobiana contra bactérias *Gram* negativas (*Staphylococcus aureus*), bactérias *Gram* positivas (*Escherichia coli*, e *Bacillus megaterium*) e fungos (*Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Verticillium albo-atrum* e *Mucor racemosus*). Através da análise comparativa dos quatro tipos de extratos quanto à composição química e atividade antimicrobiana, Greche *et al.* (2009) concluíram que a constituição em mono e sesquiterpenos foi diminuindo e a de flavonoides e diterpenos aumentando na seguinte ordem: óleo essencial, concreto, absoluto e resinoide, sendo que, também por esta ordem a

eficiência da atividade antimicrobiana foi diminuindo. Desta forma, é sugerida uma relação direta entre a presença de mono e sesquiterpenos, compostos da família dos terpenos, e a maior eficácia de atividade antimicrobiana (50).

Diversos bioextratos, incluindo extratos hidroalcoólicos, aquosos, metanólicos, clorofórmicos, entre outros, mostraram ter atividade antimicrobiana contra bactérias *Gram* positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*), bactérias *Gram* negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Helicobacter pylori*), leveduras (*Candida tropicalis*, *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida parapsilosis*) e fungos (*Geotrichum citri-aurantii*) (58,69,72-74). Através da análise bibliográfica é, ainda, concluído que extratos aquosos apresentam uma elevada constituição em compostos polifenólicos e flavonoides e uma forte atividade antimicrobiana contra *S. aureus* quando comparada com a *E. coli* (58,73).

1.3.6.2. Atividade Antioxidante

Estudos feitos, tanto a óleos essenciais como a outros tipos de bioextratos de *C. ladanifer*, nomeadamente a bioextratos aquosos, etanólicos, metanólicos e hidroacetanólicos, mostram que para além de serem constituídos por compostos fenólicos e flavonoides, apresentam uma potente atividade antioxidante (34,58-60,75).

Quando se trata de uma relação entre bioextratos adquiridos a partir de compostos com alta afinidade, para compostos fenólicos e flavonoides, como o etanol, estes apresentam uma capacidade antioxidante superior à dos óleos essenciais, facto este que permite estabelecer uma relação entre a presença destes compostos e a atividade antioxidante dos bioextratos (34,56,60).

1.3.6.3. Atividade Citotóxica

Estudos realizados, a bioextratos aquosos, etanólicos e acetólicos, concluíram que existe uma relação entre a composição em compostos fenólicos e flavonoides dos bioextratos de *C. ladanifer* e a citotoxicidade dos mesmos (58,60).

Investigações que procuraram estudar a ação destes compostos, independentemente da sua origem, na indução da citotoxicidade, demonstraram que estes são capazes de a induzir em certas células cancerígenas, mas que em células “normais” (hepatócitos, macrófagos, fibroblastos da pele e células endoteliais) este efeito apenas se verifica em elevadas concentrações de composto alterado (76,77). Explicam este facto com a existência de algum tipo de mecanismos defensivo nas células que as permite protegerem-se destes compostos e que em certas células cancerígenas se encontra alterado (76,77). Esta conclusão é, também, comprovada por Barrajon-Catalán E. *et al.* (2009) que mostraram que estes compostos afetam as células cancerígenas sendo que umas lhes são resistentes e outras sensíveis, comprovando

realmente, que o mecanismo defensivo destes compostos se encontra alterado nestas células (58).

Tal como já referido, por vezes uma análise comparativa entre estudos torna-se difícil, dada a diversidade das partes da planta utilizadas para obter os extratos, a diversidade de métodos disponíveis para obter esses mesmos extratos, a diversidade de técnicas existentes para analisar a composição desses mesmos extratos, entre outras variáveis. Assim, a tabela 5 pretende apresentar de uma forma simplificada, alguns dos estudos realizados com a planta *Cistus ladanifer*, demonstrando a diversidade de possibilidades de estudos.

Tabela 5 - Tabela resumo de investigações desenvolvidas com a planta *Cistus ladanifer*. O nome dos compostos está em língua inglesa para não confundir a tradução literária dos mesmos.

Parte da planta utilizada	Tipo de extrato	Compostos maioritários/Compostos em estudo	Bioatividade em estudo	Referência
Partes aéreas	Aquoso	Gallic acid	Antioxidante Antimicrobiana Citotóxica	(58) e (70)
		Punicalin		
		2 punicalagin isomers (ellagitannins)		
		Punicalagin-gallate		
		Hexahydroxydiphenoyl-glucose		
		3,4'-dihydroxypropiofenone-3-Beta-D-glucoside		
Partes aéreas	Óleo essencial	Apigenin diglucoside	Herbicida	(53)
		Trans-pinocarveol		
		Viridiflorol		
		Bornyl acetate		
		Terpinen-4-ol		
		2(10)-pinen-3-one		
Ramos e folhas	Óleo essencial	Alfa-pinene	Antimicrobiana	(50)
		Camphene		
		Camphene		
		Terpinen-4-ol		
		Bornyl acetate		
		Ledol		
		Viridiflorol		

Folhas	Metanólico e Etanólico	Viridiflorol Blumenol Limonene Spathulenol	Antioxidante	(59)
Folhas	Metanólico	Punicalagin gallate 2 Punicalagin isomers Punicalagin gallate	Antifúngica	(69)
Folhas	Diclorometanólico	Acetophenone 2,2,6-trimethylcyclohexanone Borneol 2-phenylethanol	Não estudada	(61)
Folhas	Óleo essencial	Alfa-pinene Camphene Fenchona Bornil acetate Viridiflorol	Antibacteriana	(28)
Folhas e ramos	Óleo essencial	Alfa-pinene Viridiflorol globulol Unknow sesquiterpene alcohol	Não estudada	(78)
Folhas e ramos	Óleo essencial	Alfa-pinene Viridiflorol Ledol Bornyl acetate	Não estudada	(79)

Rebentos	Hexanólico	Benzenepropanoic acid Viridiflorol Alfa-pinene Camphene Borneol	Não estudada	(80)
Não menciona	Aquoso e liofilizado	Shikimic acid Gentisoyl glucoside Betuloside	Antioxidante Antibacteriana	(73)
	Aquoso e secagem por pulverização	Punicalin		
	Hidroalcoólico e secagem por pulverização	Betuloside Labdanolic acid		
		Apigenin metilether Kaempferol dimetilether Gentisoyl glucoside Kaempferol diglycoside		
Não menciona	Óleo essencial	Fenóis totais	Antioxidante	(75)
Frutas, ramos, flores e folhas	Óleo essencial	Alfa-pinene Camphene Terpinen-4-ol Borneol	Antioxidante	(56)

1.4. Objetivo Geral

Esta dissertação e todo o trabalho laboratorial desenvolvido têm como principal objetivo analisar a aplicabilidade de dois extratos de *Cistus ladanifer* subsp. *ladanifer*, o óleo essencial e o hidrolato, como ingredientes para o desenvolvimento de produtos cosméticos.

Numa abordagem mais detalhada podem se elencar os seguintes objetivos para este trabalho:

- Caracterizar quimicamente os extratos;
- Determinar *in vitro* a atividade antibacteriana e antifúngica sobre microrganismos padrão para avaliação do efeito conservante de ingredientes em formulações cosméticas;
- Determinar *in vitro* a atividade antioxidante dos extratos, para avaliação da sua potencialidade em produtos de anti-envelhecimento;
- Determinar *in vitro* a atividade citotóxica dos extratos em linhas celulares da pele: fibroblastos e queratinócitos;
- Estabelecer uma relação entre a composição química dos extratos e as suas atividades biológicas.

Adicionalmente, o processo de aprendizagem e enriquecimento técnico alcançados contam, também, como objetivos e propósitos deste trabalho.

CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA

2.1. Considerações Gerais





Os quatro extratos de *Cistus ladanifer* subsp. *ladanifer*, dois hidrolatos e dois óleos essenciais, foram adquiridos comercialmente da Aromas do Valado[®], sediada em Idanha-a-Nova, Castelo Branco, Portugal, e da Ervitas Catitas[®], sediada em Pegões, Setúbal, Portugal. Cada empresa foi responsável por fornecer o óleo essencial e o seu respetivo hidrolato (tabela 6).

Ao longo desta dissertação, serão adotadas as seguintes siglas:

- Óleo Essencial da empresa Aromas do Valado[®]: OE-AV;
- Hidrolato da empresa Aromas do Valado[®]: H-AV;
- Óleo Essencial da empresa Ervitas Catitas[®]: OE-EC;
- Hidrolato da empresa Ervitas Catitas[®]: H-EC.

A espécie *Cistus ladanifer* subsp *ladanifer*, será designada por *C. ladanifer*.

Tabela 6 - Detalhes dos extratos em estudo.

Aromas do Valado [®]		Ervitas Catitas [®]	
Hidrolato	Óleo Essencial	Hidrolato	Óleo Essencial
H-AV	OE-AV	H-EC	OE-EC
			
Lote: não referenciado	Lote: não referenciado	Lote: 06CL17	Lote: 5CL16

O óleo essencial com o qual se iniciaram os trabalhos laboratoriais, OE-AV, não foi suficiente para realizar todos os objetivos propostos nesta investigação sendo que a empresa já não dispunha de amostra adicional. Deste modo, recorreu-se a um outro, OE-EC, da mesma espécie

e da mesma região geográfica. Assim, na tabela 7 estão explicitados os extratos utilizados para estudar cada uma das atividades.

Tabela 7 - Tabela indicativa do extrato e das atividades avaliadas para cada amostra. “Sim” indica que a atividade foi realizada para esse extrato. “Não” indica que a atividade não foi realizada para esse extrato.

Extratos	Atividade Antimicrobiana	Atividade Antioxidante	Atividade Citotóxica
OE-AV	Sim	Não	Não
H-AV	Sim	Sim	Sim
OE-EC	Sim	Sim	Sim
H-EC	Sim	Sim	Sim

2.1.1. Objetivo

Este capítulo teve como objetivo caracterizar quimicamente os extratos da planta *C. ladanifer*, hidrolato e óleos essencial.

2.2. Parte Experimental

2.2.1. Materiais e Métodos

2.2.1.1. Análises Fitoquímicas dos Hidrolatos

Os testes fitoquímicos são realizados quando se pretende avaliar a presença de determinadas classes químicas de compostos como os fenóis, os taninos, as saponinas, os terpenóides, entre outras. Estes testes, considerados *standard*, diferem nos compostos orgânicos utilizados na maneira em que estes extrairão seletivamente compostos de classes químicas para os quais terão afinidade e cuja presença no extrato se pretende analisar (81).

Assim, e como testes preliminares à identificação da composição dos hidrolatos por GC-MS, foram realizados testes fitoquímicos, com o objetivo de analisar qualitativamente a presença de terpenóides, pelos testes de Salkowski e de Liebermann Burchard, e de fenóis, pelo teste do cloreto de ferro. Os testes foram adaptados de Y. Vaghasiya *et al.* (2011) (81).

1. Testes para determinar terpenóides: Teste de Salkowski

Este teste tem como objetivo detetar a presença de terpenos sem especificar as subclasses destes. É realizado da seguinte forma: a 1 ml de hidrolato adiciona-se 1 ml de clorofórmio (JMGS Lda) e 1 ml de ácido sulfúrico (JMGS Lda). Os tubos foram agitados lentamente e a mudança de cor foi sendo observada. Caso o hidrolato tenha presente na sua constituição terpenóides, a solução irá alterar de incolor para uma cor próxima do vermelho. Em paralelo, é realizado um ensaio no qual se substitui o hidrolato por água destilada, constituindo este o ensaio de controlo.

2. Testes para determinar triterpenos: Teste de Liebermann Burchardt

Este teste tem como objetivo determinar se a solução em análise terá triterpenos e apenas faz sentido ser realizado após a realização do Teste de Salkowski. É realizado da seguinte forma: a 1 ml de hidrolato adiciona-se, pela seguinte ordem, 1 ml de clorofórmio (JMGS Lda), 1 ml de ácido acético (JMGS Lda) e 1 ml de ácido sulfúrico (JMGS Lda). Os tubos foram agitados lentamente e a mudança de cor foi sendo observada. Caso o hidrolato tenha presente na sua constituição triterpenos, a solução irá alterar de incolor para uma cor próxima do verde. Em paralelo, é realizado um ensaio no qual se substitui o hidrolato por água destilada, constituindo este o ensaio de controlo.

3. Testes para determinar os fenóis: Teste do Cloreto de Ferro

Este teste tem como objetivo averiguar a presença de taninos, um tipo de fenóis, numa determinada amostra. É realizado da seguinte forma: a 1 ml de hidrolato adiciona-se 1 ml da solução de cloreto de ferro a 2 %. Os tubos foram agitados lentamente e a mudança de cor foi sendo observada. Caso o hidrolato tenha presente na sua constituição fenóis, a solução irá alterar de amarelo (cor da solução de ferro adicionada) para uma cor próxima do violeta. Em paralelo, é realizado um ensaio no qual se substitui o hidrolato por água destilada, constituindo este o ensaio de controlo.

4. Teste Folin Ciocalteu

O teste Folin Ciocalteu é um método colorimétrico utilizado para quantificar os fenóis totais de uma amostra (H-AV e H-EC) (82).

Numa cuvete e de forma a preparar o branco dos ensaios, foram adicionados 1,45 ml de água destilada e 0,05 ml do reagente Folin Ciocalteu (PanReac AppliChem). Noutras duas cuvetes, cada uma para o respetivo hidrolato, adicionar em cada uma 1,4 ml de água destilada, 0,05 ml do reagente Folin Ciocalteu e 0,05 ml de hidrolato (esta parte foi executada num conjunto de

3 cuvetes para cada hidrolato, para ser feita uma média dos resultados). Num conjunto de cuvetes em número igual às soluções diluídas de ácido gálico, compreendidas na faixa de 0 a 450 mg/L (em intervalos de 50 mg/L), adicionar 1,4 ml de água destilada, 0,05 ml do reagente Folin Ciocalteu e 0,05 ml de cada solução diluída de ácido gálico. Estas cuvetes repousaram durante 5 minutos e, posteriormente, em cada uma delas foi adicionado 1ml de carbonato de cálcio a 7,5 % e a mistura foi deixada a incubar (incubadora Thermo Scientific) no escuro durante 60 minutos a 30 °C. Findo este período foram lidas as absorvâncias a 765 nm num espectrofotómetro (SPECORD®200 Plus). Os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico (mg GAE/L), tendo em conta a equação da curva de calibração do ácido gálico.

2.2.1.2. Identificação e Quantificação dos Compostos: Óleo Essencial e Hidrolato

O perfil volátil dos óleos essenciais de *C. ladanifer*, OE-AV e OE-EC, foi obtido por cromatografia gasosa acoplada a um espectrofotómetro de massa (GC-MS), cuja identificação e análise foram gentilmente cedidos pelas empresas produtoras. Ambos os cromatogramas são apresentados no anexo 1 e serão analisados neste capítulo.

O perfil volátil dos hidrolatos de *C. ladanifer*, H-AV e H-EC, foi obtido por cromatografia gasosa acoplada a um espectrofotómetro de massa (GC/MS SCION-SQ 456 GC, Bruker), em triplicado. Os compostos voláteis foram separados numa coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (30 m comprimento x 0.025 mm de diâmetro x 0.25 µm de espessura, Agilent J&W GC Columns), sendo utilizado o hélio como gás de arraste, com um fluxo de 1 ml/min. O hidrolato foi injetado com uma concentração de 1 mg/ml (0.5 µL), utilizando-se um split de 1:10. A programação de temperatura iniciou-se a 45 °C, aumentando gradualmente 3 °C /min até aos 175 °C, finalmente aumenta até aos 300 °C com uma razão de aquecimento de 15 °C/min, mantendo-se nesta temperatura final durante 10 min. O injetor e o detetor foram mantidos a 220 °C e 250 °C, respetivamente. A identificação dos compostos foi baseada na comparação dos espectros de massa com os espectros de massa da biblioteca NIST incluída no *software* do equipamento. A quantidade relativa de cada composto foi expressa em percentagem da área relativa ao pico do composto relativamente à área total dos picos identificados da amostra. Esta análise foi realizada no Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior do Instituto Politécnico de Castelo Branco.

2.2.2. Resultados e Discussão

Os resultados obtidos para os testes fitoquímicos que pretendem analisar a presença de terpenos, triterpenos e taninos na composição dos hidrolatos, H-AV e H-EC, encontram-se representados na tabela 8. Os resultados são iguais para ambos os hidrolatos. As figuras 2 a 4,

apresentam as fotografias retiradas, no final de cada ensaio, aos tubos utilizados nos respectivos testes.

Os resultados obtidos para a quantificação dos fenóis totais presentes nos hidrolatos, H-AV e H-EC, encontram-se representados na tabela 9. A figura 6 apresenta uma fotografia do conjunto de cuvetes que foram lidas no espectrofotômetro e que serviram para realizar o respectivo ensaio.

A tabela 10 indica a composição dos hidrolatos, H-AV e H-EC, bem como a quantidade relativa de cada composto face aos compostos totais identificados. No anexo 2 está presente a mesma informação relativa aos óleos essenciais, OE-AV e OE-EC.

Tabela 8 - Tabela com os resultados obtidos para os testes de Salkowski, de Liebermann Burchardt e do Cloreto de Ferro para os hidrolatos, H-AV e H-EC. “Positivo” - presença da classe de compostos em teste. “Negativo” - ausência da classe de compostos em teste.

	Teste de Salkowski (Terpenos)		Teste de Liebermann Burchardt (Triterpenos)		Teste do Cloreto de Ferro (Taninos)	
	Controlo	Ensaio	Controlo	Ensaio	Controlo	Ensaio
Cor	Incolor	Alaranjado	Incolor	Incolor	Amarelo	Amarelo
Resultado	Positivo		Negativo		Negativo	

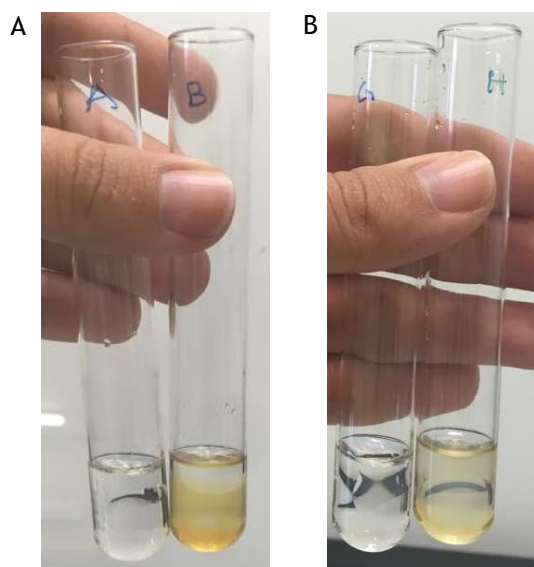


Figura 2 - Fotografias dos resultados obtidos para o teste de Salkowski para os hidrolatos. A: H-AV e respetivo controlo; B: H-EC e respetivo controlo.

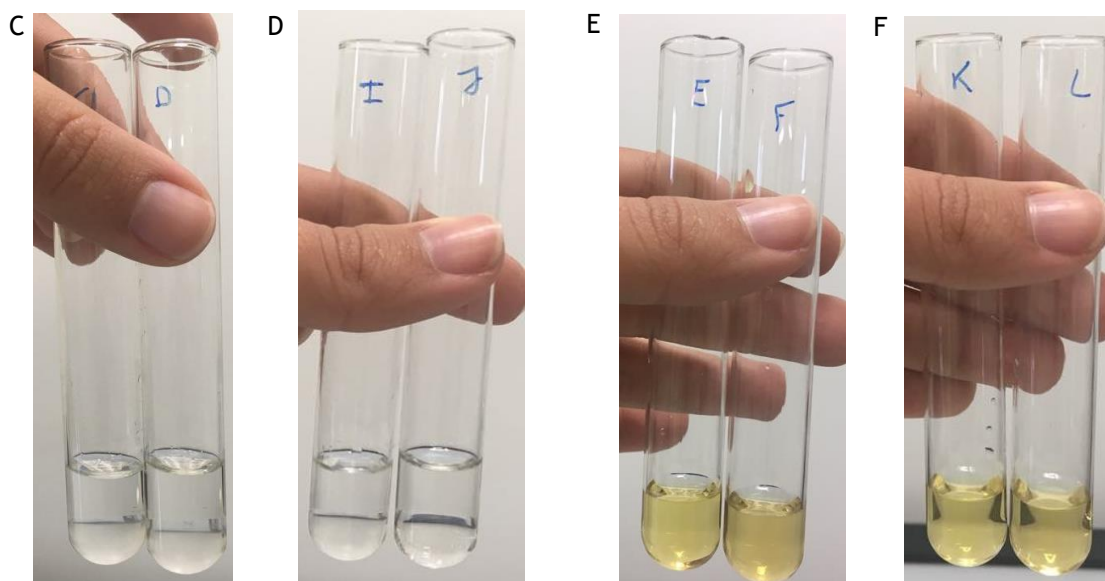


Figura 3 - Fotografias dos resultados obtidos para o teste de Liebermann Burchardt para os hidrolatos. C: H-AV e respetivo controlo; D: H-EC e respetivo controlo.

Figura 4 - Fotografias dos resultados obtidos para o teste de Cloreto de Ferro para os hidrolatos. E: H-AV e respetivo controlo; F: H-EC e respetivo controlo.

Tabela 9 - Resultados obtidos para a quantificação dos fenóis totais dos hidrolatos, H-AV e H-EC, pelo teste Folin Ciocalteu.

Amostra	Fenóis Totais (mg GAE/L)
H-AV	0,3036 ± 0,03116
H-EC	0,3639 ± 0,0651

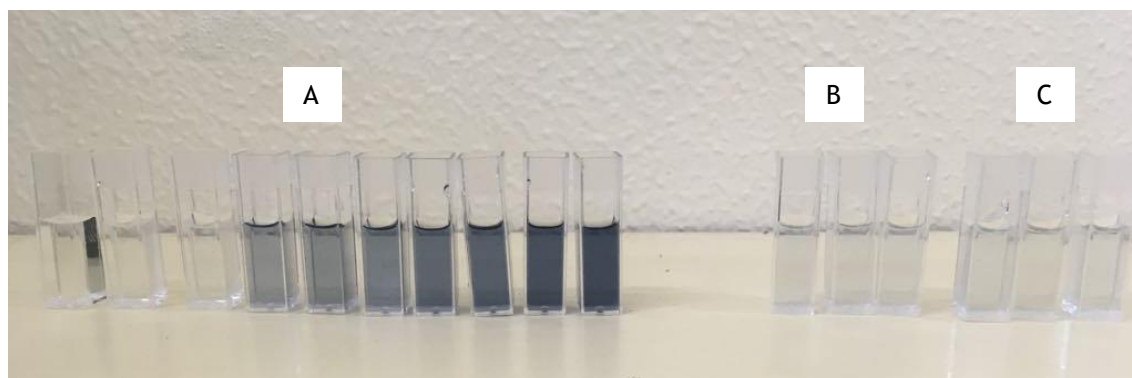


Figura 5 - Fotografia do teste de Folin Cicalteu (os controlos brancos não foram fotografados). A - conjunto de cuvets preparadas para o ácido gálico. B - conjunto de cuvets preparadas para o H-AV. C - conjunto de cuvets preparadas para o H-EC.

Tabela 10 - Composição química dos hidrolatos da planta *C. ladanifer*, em estudo. A % de área representa a quantidade relativa de cada composto, obtida através da relação entre a área relativa do composto e a área total dos picos identificados na amostra.

Nome do Composto	H-AV (% Área)	H-EC (% Área)
4-Hidroxi-4-metilpentan-2-one	1,11	-
Borneol	8,45	6,83
<i>p</i> -Cimen-8-ol	10,69	6,94
(-)-Mirtenol	11,17	3,16
D-Verbenona	9,81	20,05
<i>trans</i> -Carveol	5,77	-
<i>p</i> -Cimen-7-ol	2,07	-
4-Hidroxi-3-metoxibenzaldeído	21,58	32,58
2,5-Di(1,1-dimetiletil)-fenol	1,80	-
2-Fenil-etanol	-	5,85
Isopinocarveol	-	1,28
Terpinen-4-ol	-	5,13
Alfa-Terpineol	-	3,24
3-Fenilpropionato de etilo	-	3,55
<i>trans</i> -Isoeugenol	-	1,15
Indefinidos	26,54	10,25
% Total de compostos identificados	73,45	89,75

O Teste de Salkowski pretende averiguar a presença de terpenos na composição dos hidrolatos, H-AV e H-EC, e o Teste de Liebermann Burchart pretende complementar esta informação indicando se dos terpenos existentes alguns pertencem à subclasse dos triterpenos. Analisando os resultados obtidos (tabela 8), comparativamente com os controlos, é possível observar que o Teste de Salkowski deu positivo para ambos os hidrolatos, H-AV e H-EC, já que foi observável uma alteração da cor da solução que contém o hidrolato em teste, de incolor para uma coloração alaranjada (figura 2). Desta forma, pode afirmar-se que na composição de ambos os hidrolatos existem compostos que pertencem à família dos terpenos, e que o H-AV os apresenta em maior concentração, já que a intensidade da coloração do ensaio é maior do que a do H-EC

O Teste de Liebermann Burchart comprovou, para ambos os hidrolatos que, dos compostos pertencentes à família dos terpenos, não se incluem triterpenos. Os resultados obtidos (tabela 8), quando analisados face ao controlo, mostram que não houve alteração da coloração da solução que contém o hidrolato em teste, de incolor para uma cor próxima do verde (figura 3).

Quanto ao teste que permite a identificação específica de taninos, Teste do Cloreto de Ferro, verifica-se que nenhum dos hidrolatos, H-AV e H-EC, apresenta na sua composição este tipo de compostos, já que a solução que contém o hidrolato em teste não alterou a sua cor face ao controlo (tabela 8 e figura 4).

Ainda que os taninos sejam uma classe de compostos fenólicos, o teste referido anteriormente não permite concluir se existem outro tipo de fenóis na constituição dos hidrolatos pelo que, desta forma, se procedeu à quantificação dos fenóis totais pelo Teste Folin Ciocalteu (tabela 9). Este permite concluir que o H-EC apresenta uma maior composição em fenóis do que o H-AV, já que apresenta valores, expressos em equivalentes de ácido gálico, superiores, $0,3639 \pm 0,0651$ mg GAE/L e $0,3036 \pm 0,03116$ mg GAE/L, respetivamente.

Relativamente à composição química dos hidrolatos, H-AV e H-EC, (tabela 10) são identificados, respetivamente, nove (9) e onze (11) compostos. Para ambos, H-AV e H-EC, o 4-Hidroxi-3-metoxibenzaldeído destaca-se como o composto maioritário, representando 21,58 % e 32,58 %, respetivamente, dos compostos totais. Em conjunto com os testes preliminares, Teste de Folin Ciocalteu e o Teste do Cloreto de Ferro, é possível verificar, respetivamente, que a maior percentagem deste composto apresentada pelo H-EC justifica a seu maior composição em fenóis totais, e que este é um composto fenólico que não constitui um tanino. O borneol, o p-Cimen-8-ol, o (-)-Mirtenol e a D-Verbenona são, também, comuns aos dois hidrolatos. O borneol, surge, em ambos os hidrolatos, H-AV e H-EC, em concentrações não muito diferentes entre si, 8,45 % e 6,83 %, respetivamente. Contrariamente, o p-Cimen-8-ol, o (-)-Mirtenol e a D-Verbenona surgem em percentagens bastante diferentes entre hidrolatos, H-AV e H-EC. Para o H-AV, o p-Cimen-8-ol (10,69 %) e o (-)-Mirtenol (11,17 %) mostram-se relevantes na sua constituição, embora não sejam maioritários, seguindo-se da D-Verbenona (9,81 %). O H-EC, mostra um comportamento totalmente oposto, onde o p-Cimen-8-ol (6,94 %) e o (-)-Mirtenol (3,16 %) surgem em percentagens bastante inferiores que a D-Verbenona (20,05 %), que se apresenta como o segundo composto com relevância na constituição química deste hidrolato. Estes compostos (borneol, p-Cimen-8-ol, (-)-Mirtenol e D-Verbenona) podem ser analisados de forma conjunta contemplando o efeito sinérgico entre eles e, desta forma, representam, 40,12 % e 36,98 % dos compostos totais do H-AV e H-EC, respetivamente. A partir dos testes preliminares, Teste de Salkowski e o Teste de Liebermann Burchart, e com a informação presente na introdução teórica desta dissertação, é possível afirmar que este conjunto de compostos pertence à família dos terpenos, mas nenhum deles pertence à subclasse dos triterpenos.

Relativamente à composição química dos óleos essenciais, OE-AV e OE-EC, (anexo 2) são identificados, respetivamente, dezassete (17) e trinta e um compostos (31) nos óleos essenciais

OE-AV e OE-EC, sendo que ambos apresentam uma composição muito semelhante em compostos majoritários. O OE-AV contém majoritariamente alfa-pineno (38,30 %), canfeno (16,06 %), 2,2,6-trimetilciclohexanona (8,56 %) e acetato de borneol (5,37 %), já o OE-EC contém alfa-pineno (29,09 %), canfeno (6,56 %) e acetato borneol (5,40 %). É de salientar, ainda, que, e embora não sejam considerados como majoritários, ambos os óleos essenciais, OE-AV e OE-EC, apresentam na sua constituição o limoneno (1,60 % e 1,16 %, respetivamente) e o borneol (1,05 % e 1,23 %, respetivamente). Os compostos majoritários pertencem à família dos terpenos, sendo o alfa-pineno e o canfeno monoterpénos não oxigenados e o acetato de borneol um monoterpénio oxigenado. O 2,2,6-trimetilciclohexanona é um norisopreno sendo um dos principais responsáveis pelo odor característico que os extratos de *C. ladanifer* apresentam. Também o limoneno e o borneol pertencem a esta família de compostos sendo monoterpénos, não oxigenado e oxigenado, respetivamente. Estes estudos estão de acordo com outros que referenciam estes compostos como os majoritários em óleos essenciais de *C. ladanifer*, que foram extraídos e analisados nas mesmas condições que as do presente estudo (28,50,78,79).

2.3. Conclusão

As análises fitoquímicas preliminares permitem concluir que:

- O H-AV apresenta mais compostos pertencentes à família dos terpenos do que o H-EC, sendo que nenhum destes compostos pertence à subclasse triterpenos;
- Ambos os hidrolatos não apresentam taninos na sua constituição;
- O H-EC apresenta uma maior constituição em compostos fenólicos do que o H-AV.

A caracterização química dos hidrolatos, permite concluir que:

- Ambos apresentam o 4-Hidroxi-3-metoxibenzaldeído, um composto fenólico, como composto majoritário;
- Ambos apresentam um conjunto de compostos pertencentes à família dos terpenos (borneol, p-Cimen-8-ol, (-)-Mirtenol e D-Verbenona) cujo efeito sinérgico resulta numa composição, face ao volume total de compostos, superior à do composto majoritário.

A caracterização química dos óleos essenciais, permite concluir que:

- Ambos apresentam como compostos majoritários o alfa-pineno, o canfeno e o acetato de borneol, compostos da família dos terpenos, sendo que o OE-AV os apresenta em maior concentração, face ao volume total de compostos do óleo;
- O presente estudo é corroborado por investigações realizadas a óleos essenciais de *C. ladanifer*, extraídos e analisados nas mesmas condições que as do presente estudo.

CAPÍTULO 3

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

3.1. Considerações Gerais

Atualmente, existem vários métodos para medir a suscetibilidade *in vitro* de microrganismos aos agentes antimicrobianos, incluindo-se nestes o método de difusão em ágar e os métodos de diluição em meio líquido: macrodiluição ou microdiluição (25-27).

A microdiluição, técnica realizada no presente estudo, permite avaliar a atividade antimicrobiana (antibacteriana e antifúngica) de uma pequena quantidade de amostra, sendo que os seus resultados são quantitativos e traduzem-se em valores de concentração mínima inibitória (CMI) e de concentração mínima letal (CML) do crescimento microbiano. Esta técnica é realizada numa placa estéril de 96 poços, permitindo testar um vasto intervalo de diluições da amostra, que se refletem nas concentrações em teste, sendo preparadas diretamente na placa, pipetando a solução do poço anterior para o poço seguinte. O crescimento microbiano nos poços é visualizado a olho nu, através da turvação do meio e tendo como referência os poços de controlos positivo (microrganismo inoculado no meio de cultura) e negativo (ensaio de esterilidade do meio de cultura não inoculado) (25-27,30).

Segundo as normas publicadas pela NCCLS: **M7-A6** - Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico; **M27-A2** - Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica e **M38-A** - Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação de Sensibilidade a Terapia Antifúngica dos Fungos Filamentosos, a concentração mínima inibitória é definida como “a menor concentração de um agente antimicrobiano que impede o crescimento visível de um microrganismo no teste de sensibilidade por diluição em ágar ou caldo” (25-27).

A concentração mínima letal corresponde à mais baixa concentração capaz de matar a totalidade das células e foi determinada recorrendo à contagem de unidades formadoras de colónias (UFC), em meio de cultura sólido, de todas as suspensões presentes nos poços, da placa de 96 poços, onde não se verificou crescimento microbiano e até à suspensão correspondente à CMI, segundo a metodologia adotada por Vieira *et al.* (2017) (28).

3.1.1. Objetivo

Este capítulo tem como objetivo determinar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos da planta *C. ladanifer*, hidrolato e óleo essencial, em microrganismos considerados indicadores da eficácia conservante em produtos cosméticos e farmacêuticos, bem como espécies consideradas patogénicas relevantes em infeções da pele. Para isso, foi determinada a atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos através do método de microdiluição em

meio líquido, conforme descrito nas normas: M7-A6, M27-A2 e M38-A. Os valores de CMI e CML dos extratos foram obtidos para os microrganismos em estudo.

3.2. Parte Experimental

3.2.1. Materiais e Métodos

3.2.1.1. Estirpes

Para a análise da atividade antimicrobiana de ambos os extratos, hidrolato e óleo essencial, foram incluídas seis espécies de bactérias aeróbias, quatro exemplares do tipo *Gram* positiva e dois exemplares do tipo *Gram* negativa, e duas espécies de fungos, uma levedura e um fungo filamentosos.

As diferentes estirpes utilizadas, bem como algumas informações que lhes são relativas, encontram-se detalhadas na tabela 11. Estas foram adquiridas em coleções de culturas internacionais ATCC e selecionadas de acordo com os critérios admitidos pelo SCCS e estabelecidos pelas farmacopeias europeia e americana para os testes que avaliam a proteção antimicrobiana em produtos cosméticos.

Tabela 11 - Estirpes, bacterianas e fúngicas, utilizadas no estudo da atividade antimicrobiana.

Espécie de bactéria	Estirpe	Classificação quanto ao tipo de <i>Gram</i>	Indicador de Eficácia Conservante	Patogéneo relevante
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	<i>Gram</i> positiva	X	X
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 178970		-	X
<i>Enterococcus hirae</i>	ATCC 179954		-	X
<i>Streptococcus agalactiae</i>	ATCC 181324		-	X
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027	<i>Gram</i> negativa	X	X
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739		X	X
Espécie de fungo	Estirpe	Classificação		
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	Levedura	X	X
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC 16404	Fungo filamentosos	X	X

3.2.1.2. Reagentes

O meio *Tryptic Soy Agar*, TSA (VWR Chemicals, Prolabo®) foi utilizado como meio sólido para a cultura de bactérias, e o meio *Mueller-Hinton Broth*, MHB (VWR Chemicals, Prolabo®) foi utilizado como meio de cultura líquido, na realização dos ensaios e na preparação dos inóculos.

O meio *Sabouraud-Dextrose Agar*, SDA (VWR Chemicals, Prolabo), foi utilizado como meio sólido para a cultura da levedura e o meio *Potato-Dextrose Agar*, PDA (VWR Chemicals, Prolabo®) foi utilizado com a mesma finalidade mas para o fungo filamentosos. O meio RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) (Sigma-Aldrich®), foi utilizado como meio de cultura líquido, na preparação de ambos os inóculos e na realização dos ensaios. O tampão MOPS, ácido morfolinopropanesulfónico (BioReagents™), foi utilizado na preparação do meio RPMI-1640.

A solução salina (NaCl) (FisherChemical), foi utilizada para preparar a suspensão celular no processo de preparação do inóculo.

O composto dimetilsulfoxido (DMSO) (FisherChemical), foi utilizado como solvente do OE-AV em meio de cultura aquoso.

O composto *Tween 20* (PanReac AppliChem, ITW Reagents), foi utilizado como solvente do OE-EC em meio de cultura aquoso.

A resazurina (Sigma-Aldrich®), foi utilizada como marcador de crescimento microbiano nos ensaios com o OE-EC.

Considerações: Óleo Essencial

O ensaio de compostos oleosos em meios aquosos pressupõe a estabilização da emulsão do óleo em água, pelo que é necessário adicionar um emulsionante ou um solvente ao meio de cultura que assegure a solubilização do óleo essencial durante todo o ensaio. Dois dos agentes emulsionantes normalmente utilizados são o DMSO e o *Tween 20*, contudo em certas concentrações estes podem tornar-se tóxicos para os microrganismos em estudo (83). Desta forma, é necessário garantir a concentração máxima de emulsionante tolerada pelos microrganismos e que, ao mesmo tempo, seja eficaz a emulsionar o óleo essencial no meio de cultura líquido.

O DMSO foi o emulsionante utilizado para os ensaios com o OE-AV. No entanto, este composto, nas concentrações toleradas pelos microrganismos, não se mostrou capaz de emulsionar o OE-EC, pelo que neste caso utilizou-se o *Tween 20* (84). Nos anexos 3 e 4, encontram-se descritos os ensaios realizados para a validação, e posterior implementação, do método da utilização destes dois compostos como emulsionantes.

Não se optou pela utilização de *Tween 20* no caso do OE-AV visto que este, contrariamente ao DMSO, tem a particularidade de deixar a solução (óleo essencial, meio, *Tween 20*) esbranquiçada (figura 7) o que, na placa de 96 poços, dificultou a visualização do crescimento microbiano por turvação do meio. Deste modo, para os ensaios em que se utilizou este emulsionante, foi necessário utilizar a resazurina como marcador do crescimento microbiano (83). O mecanismo de ação deste composto, que apresenta cor púrpura, baseia-se na sua redução, por enzimas citoplasmáticas das células bacterianas, num composto denominado de resafurina de cor rosa, relacionando-se, desta forma, diretamente com a quantidade de organismos vivos (figura 6) (83,84). Tal como os emulsionantes, em certas concentrações a resazurina torna-se tóxica para os microrganismos em estudo pelo que antes da sua utilização foi necessário validar o método para, posteriormente, poder ser implementado (anexo 4).

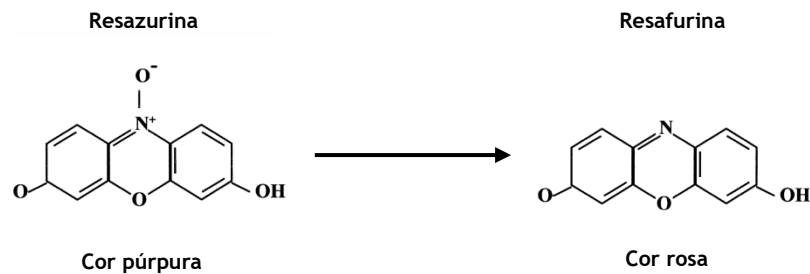


Figura 6 - Conversão do composto resazurina no composto resafurina. Imagem adaptada de (84).



Figura 7 - Aspeto da solução de trabalho do OE-EC.

3.2.1.3. Determinação da Concentração Mínima Inibitória

A CMI dos extratos foi determinada de acordo com o método da microdiluição descrito na norma M7-A6, para as bactérias, e nas normas M27-A2 e M38-A, para a levedura e para o fungo filamentosos, respetivamente.

1. Preparação das soluções de trabalho: Hidrolato

O hidrolato, por ser um composto aquoso, não necessita de um emulsionante que assegure a sua solubilização nos meios de cultura líquido utilizados para os ensaios. Deste modo, as diluições testadas para este extrato foram preparadas diretamente no meio de cultura utilizado para suportar o crescimento dos microrganismos testados.

2. Preparação das soluções de trabalho: Óleo Essencial

- OE-AV

Foi preparada uma solução mãe com 640 µl/ml de OE-AV e com DMSO a 36 %, que foi mantida armazenada no frio e utilizada aquando da preparação das placas de 96 poços. A partir desta, foi realizada uma diluição de 1:5 obtendo-se a solução de trabalho com 128 µl/ml de OE-AV e com DMSO a 7,2 % que, após sofrer uma diluição de 1:2 nos poços da linha A da placa, corresponderá à primeira diluição testada, numa concentração de 64 µl/ml de OE-AV e com DMSO a 3,6 % (concentração não tóxica para os microrganismos em estudo) (tabela 12).

- OE-EC

Foi preparada uma solução de trabalho com uma concentração de 256 µl/ml de OE-EC com o *Tween 20* a 4 % que, correspondendo a uma concentração final de 128 µl/ml nos poços da linha A da placa, visto se verificar uma diluição de 1:2 pela adição de igual volume de meio de cultura. Nesta diluição máxima testada, o *Tween 20* encontra-se a 2 %, percentagem não tóxica para os microrganismos em estudo (tabela 12).

Tabela 12 - Tabela resumo das diferentes soluções preparadas para a análise antimicrobiana: concentração de óleo essencial e percentagem de emulsionante.

Tipo de Solução	OE-AV		OE-EC	
	Concentração (µl/ml)	DMSO (%)	Concentração (µl/ml)	<i>Tween 20</i> (%)
Mãe	640	36	-	-
Trabalho	128	7,2	256	4
Linha A	64	3,6	128	2

3. Preparação da gama de concentrações em teste, na placa de 96 poços

Nos poços das linhas B a H de uma placa estéril de 96 poços (Orange Scientific) foram colocados 50 µl ou 100 µl (caso se trate da atividade antibacteriana ou da atividade antifúngica, respetivamente) de meio de cultura líquido (MHB ou RPMI) conforme o microrganismo a testar. Nos poços da linha A, dessa mesma placa, foram colocados 100 µl ou 200 µl (caso se trate da atividade antibacteriana ou da atividade antifúngica, respetivamente) de hidrolato ou da solução de trabalho de óleo essencial previamente preparada. De seguida, com uma pipeta multicanal, foram realizadas diluições sucessivas de 1:2 desde a linha A até à linha G. Da linha G para a linha H não se realizou a diluição. Desta forma, numa mesma coluna da placa, foram testadas 7 concentrações diferentes dos respetivos extratos, numa gama de soluções presente na tabela 13, e incluídos os poços de controlo positivo (linha H) que, após a inoculação, apresentaram o crescimento máximo do microrganismo.

Os ensaios foram realizados em duplicado para cada microrganismo e foram ainda incluídos os seguintes controlos, comuns para os dois tipos de extrato, nos quais não pode existir qualquer tipo de crescimento microbiano:

- Controlos negativos que asseguram a esterilidade do extrato: dois poços por cada diluição aos quais foi adicionado meio de cultura líquido;
- Controlos de esterilidade do meio: dois poços onde foi adicionado somente meio de cultura líquido.

No caso dos ensaios realizados com óleo essencial, incluiu-se ainda o controlo de ausência de toxicidade do emulsionante utilizado no ensaio, sendo por isso expectável a presença de crescimento microbiano.

- Controlo do emulsionante: dois poços para cada estirpe com o composto utilizado como emulsionante, em percentagem igual à utilizada na solução de trabalho, e ao qual foram adicionados os respetivos inóculos.

Tabela 13 - Tabela resumo das concentrações de extrato utilizadas para testar a atividade antimicrobiana de cada um deles.

Extrato	Gama de concentrações em teste (µl/ml)
H-AV	7,813 - 500 (diluições 1:2)
OE-AV	1 - 64 (diluições 1:2)
H-EC	7,813 - 500 (diluições 1:2)
OE-EC	2 - 128 (diluições 1:2)

4. Preparação do inóculo e inoculação

- **Bactérias**

Foram utilizadas culturas que cresceram no respetivo meio sólido, durante 24 horas, em estufa a 37 °C. De seguida, as colónias selecionadas foram suspensas em solução salina estéril (NaCl) a 0,85 % e a densidade ótica foi acertada a 0,5 *MacFarland*, à qual corresponde aproximadamente $1-2 \times 10^8$ células por ml de suspensão. Depois de homogeneizada, esta sofreu uma diluição (1:100), através da adição de 10 µl a 990 µl de meio líquido, constituindo, assim, a solução de trabalho do inóculo. Esta solução foi inoculada adicionando 50 µl aos poços da placa reservados para a sua adição (poços com as diluições em teste e poços do controlo positivo).

Após inoculação, a placa foi colocada a incubar em estufa (BINDER) a 37 °C durante 24 horas.

- **Levedura**

Foram utilizadas culturas que cresceram no seu respetivo meio sólido, durante 48 horas, em estufa a 37 °C. De seguida, as colónias selecionadas foram suspensas em solução salina estéril (NaCl) a 0,85 % e a densidade ótica foi acertada a 0,5 *MacFarland*, à qual corresponde aproximadamente $1-5 \times 10^6$ células por ml de suspensão. Depois homogeneizada, esta sofreu uma diluição (1:50), através da adição de 10 µl a 490 µl de meio de cultura líquido, seguida de uma segunda diluição (1:20), adicionando 200 µl da diluição anterior a 3800 µl de meio líquido, constituindo-se, assim, a solução de trabalho do inóculo. Esta solução foi inoculada na placa adicionando 100 µl aos poços da placa reservados para a sua adição (poços com as diluições de teste e poços do controlo positivo).

Após inoculação, a placa foi colocada a incubar em estufa (BINDER) a 37 °C, durante 48 horas.

- **Fungo Filamentoso**

Foram utilizadas culturas que cresceram no seu respetivo meio sólido, durante 7 dias, em estufa a 35 °C. À placa de *Petri* foi adicionado 1 ml de solução estéril (NaCl) a 0,85 % e, com o auxílio de uma ansa, as colónias foram raspadas. A mistura resultante foi pipetada para um *ependorf* que, após agitação em vortex, foi colocado a repousar até que as estruturas maiores (hifas e agregados de esporos) se depositassem no seu fundo. De seguida, foram retirados 100 µl do sobrenadante e foram adicionados a um tubo com 3 ml de meio de cultura líquido. Este tubo foi levado a um agitador vortex e, posteriormente, a suspensão foi acertada para um valor de 80 % a 82 % de transmitância a 530 nm (que equivale a uma medição entre 0,09 a 0,11 no espetrofotómetro). Desta suspensão, foi feita uma diluição (1:50) adicionando 80 µl a 3920 µl de meio líquido, correspondendo, aproximadamente, $0,4-5 \times 10^4$ células por ml de suspensão. Esta suspensão constituiu a solução de trabalho do inóculo, que foi inoculada adicionando 100 µl aos poços da placa reservados para a sua adição (poços com as diluições de teste e poços do controlo positivo).

A placa foi colocada a incubar em estufa (NUAIRE, DHD AUTOFLOW, CO₂ Air-Jacketed Incubator) a 35 °C, durante 48 horas.

Findos os períodos de tempo de incubação, foram feitas leituras visuais de crescimento microbiano, sendo anotados os valores de CMI dos respectivos extratos. A todos os poços dos ensaios com o OE-EC, foram adicionados 20 µl da solução de resazurina a 0,0525 % e a placa foi colocada a incubar por mais 4 h, coberta por papel de alumínio. Após este período de incubação, foram retirados e anotados os valores da CMI, mediante a alteração da cor púrpura para cor rosa dos poços onde ocorreu crescimento microbiano.

Considerações

Numa mesma placa puderam ser testadas mais do que uma estirpe de bactérias, sempre que asseguradas as condições necessárias para a não ocorrência de contaminações.

A levedura não foi inoculada numa mesma placa com estirpes de bactérias, pois os tempos de incubação, para a visualização do crescimento microbiano, foram diferentes.

Os fungos filamentosos, por apresentarem um elevado risco de contaminação, foram processados de forma independente das restantes estirpes e com precauções redobradas.

Estudos anteriores, realizados nomeadamente por Vieira *et al.* (2017), ressaltaram a característica da volatilidade dos óleos essenciais como um possível entrave à veracidade dos resultados obtidos na medida em esta poderia diminuir a concentração a ser, efetivamente, testada em cada poço. Para contrariar este efeito, o autor sugeriu selar a placa reduzindo-se o contacto com o ar (28). A metodologia por nós utilizada foi adaptada neste sentido, utilizando-se, para isso, papel autocolante devidamente esterilizado.

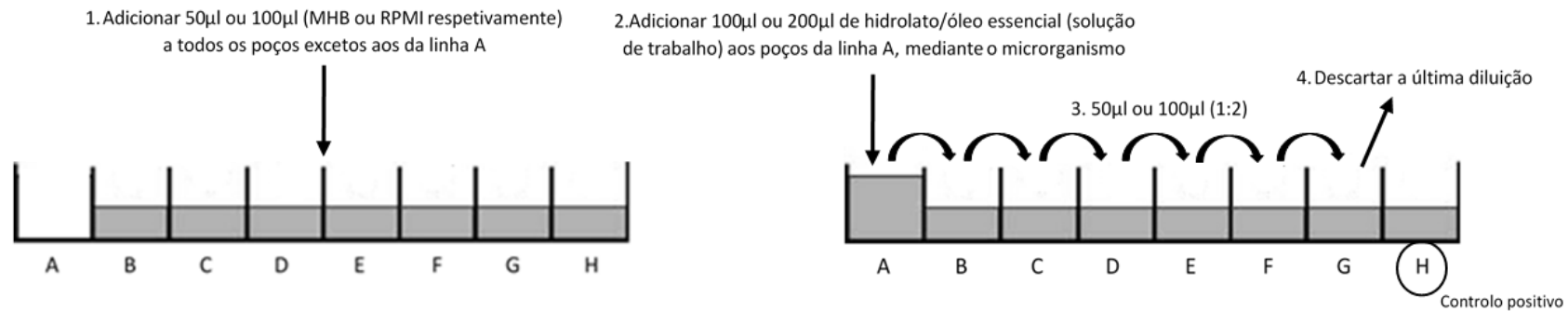
3.2.1.4. Determinação da Concentração Mínima Letal

A CML foi determinada plaqueando, para uma placa de *Petri* com meio de cultura sólido, 10 µl da suspensão presente no poço correspondente à CMI, previamente determinada, e dos poços com as concentrações mais elevadas para as quais não se observou crescimento microbiano. Esta foi incubada na estufa segundo as condições necessárias no ensaio de microdiluição para a determinação da CMI. Findos estes período de incubação, o crescimento microbiano foi verificado na placa, recorrendo à contagem de UFC e a CML correspondeu à concentração mais baixa para a qual não ocorreu crescimento microbiano (28).

A classificação do perfil de atividade do extrato é determinada considerando os valores determinados para CML e CMI. Especificamente, no caso da CML e da CMI corresponderem à mesma concentração, o efeito é considerado “cida” (bactericida ou fungicida); sendo que é considerado estático quando a concentração de CML é superior à CMI (bacteriostática ou fungistática) (30).

3.2.2. Esquema representativo da metodologia aplicada

As seguintes figuras (figuras 8 a 10) esquematizam a metodologia realizada.



1

Bactérias

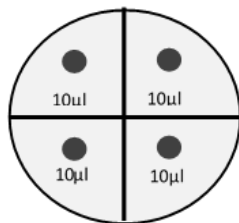
1. Selecionar colónias em cultura em meio sólido com 24h de crescimento a 37°C;
2. Suspender as colónias em NaCl a 0,85%;
3. Acertar DO=0,5 MacFarland (1-2 x 10⁸ células/ml);
4. Diluição: 1:100 (10µl da suspensão em 990µl MHB);
5. Inocular: 50µl nos poços da placa reservados para tal;
6. Incubar a 37°C durante 24h;
7. Anotar o valor do CIM.

Levedura

1. Selecionar colónias em cultura em meio sólido com 48h de crescimento a 37°C;
2. Suspender as colónias em NaCl a 0,85%;
3. Acertar DO=0,5 MacFarland (1-5 x 10⁶ células/ml);
4. Diluição: 1:50 (10µl da suspensão em 490µl RPMI);
5. Diluição: 1:20 (200µl da diluição em 3800µl RPMI);
6. Inocular: 100µl nos poços da placa reservados para tal;
7. Incubar a 37°C durante 48h;
8. Anotar o valor do CIM.

Fungo Filamentoso

1. Selecionar colónias em cultura em meio sólido com 7 dias de crescimento a 35°C;
2. Adicionar 1ml de NaCl a 0,85% sobre as colónias, raspar;
3. Pipetar a mistura e esperar pela separação de fases;
4. Adicionar 100µl do sobrenadante a 3ml de RPMI;
5. Acertar para 0,09 a 0,11 o valor de transmitância a 530nm;
6. Diluição: 1:50 (80µl da suspensão em 3920µl RPMI) – 0,4-5 x 10⁴ células/ml;
7. Inocular: 100µl nos poços da placa reservados para tal;
8. Incubar a 35°C durante 48h;
9. Anotar o valor do CIM.



1. Plaquear 10µl de cada suspensão, da placa de 96 poços onde se verificou CMI, para uma placa de *petri* com o respetivo meio;
2. Incubar sob as mesmas condições que as necessárias na preparação do inóculo.

2

Figura 8 - Esquema representativo da metodologia geral aplicada na determinação da atividade antimicrobiana dos extratos (esta pode sofrer adaptações mediante o extrato em análise). Os números representam a ordem com que os passos devem ser efetuados. As primeiras imagens representam a imagem lateral da placa de 96 poços e a última a imagem da placa de *Petri*.

Coluna		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Linha	Concentração (µl/ml)	Estirpe 1		Estirpe 2		Estirpe 3		Estirpe 4		Estirpe 5		Meio	
A	500											CRL -	CRL -
B	250											CRL -	CRL -
C	125											CRL -	CRL -
D	62,500											CRL -	CRL -
E	31,250											CRL -	CRL -
F	15,625											CRL -	CRL -
G	7,813											CRL -	CRL -
H	Meio	CRL +	CRL +	CRL +	CRL +	CRL +	CRL +	CRL +	CRL +	CRL +	CRL +	MEIO	MEIO

Figura 9 - Representação esquemática da placa de 96 poços no ensaio para determinar a CMI para os hidrolatos.

Coluna		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Linha	Concentração (µl/ml)	Estirpe 1		Estirpe 2		Estirpe 3		Estirpe 4		Meio		CRL emulsionante	
A	64									CRL -	CRL -	emuls. + 1	
B	32									CRL -	CRL -		
C	16									CRL -	CRL -	emuls. + 2	
D	8									CRL -	CRL -		
E	4									CRL -	CRL -	emuls. + 3	
F	2									CRL -	CRL -		
G	1									CRL -	CRL -	emuls. + 4	
H	Meio	CRL +	CRL +	CRL +	CRL +	CRL +	CRL +	CRL +	CRL +	MEIO	MEIO		

Figura 10 - Representação esquemática da placa de 96 poços no ensaio para determinar a CMI para o OE-AV. Adaptar para a análise do OE-EC.

Legenda:

- Contorno a negrito representa a placa de 96 poços;
- CRL + representa poço com meio de cultura líquido e respetivo inóculo;
- CRL - representa poço com meio de cultura líquido e solução diluída;
- MEIO representa poço apenas com meio de cultura líquido;
- Espaços a branco representam poços com a solução diluída e a respetivo inóculo;
- Espaços a cinzento representam o controlo do emulsionante: poços com o emulsionante na percentagem equivalente à utilizada na solução de trabalho e respetivo inóculo.

3.2.3. Tratamento dos resultados

Para os hidrolatos, H-AV e H-EC, não se observou ausência de turvação do meio dos poços com as concentrações em testes, não sendo possível determinar diretamente os valores de CMI. Desta forma, foi realizada uma análise estatística para averiguar qual a concentração de hidrolato capaz de reduzir significativamente o crescimento microbiano. Os ensaios foram realizados em duplicado para cada microrganismo, num total de 4 ensaios obtidos de forma independente (4 culturas de crescimento independente) para cada microrganismo. Para isso, as absorvâncias de cada poço foram lidas a 600 nm num leitor de microplacas (Biorad, Tokyo Japan), foram tratadas tendo em conta o controlo negativo (meio de cultura e hidrolato na respetiva concentração em teste) e convertidas em percentagens de crescimento microbiano normalizadas ao controlo positivo (crescimento dos microrganismos em meio de cultura sem adição de hidrolato, máximo crescimento do microrganismo). Foi realizada uma análise estatística T-Test por meio do programa informático GraphPad Prism (versão 7.03 para Windows, GraphPad Software, La Jolla Califórnia, EUA) (85).

Para os óleos, OE-AV e OE-EC, a análise estatística não foi realizada por dois motivos: foram obtidos valores de CMI por observação direta (poços sem turvação), e para o OE-EC a adição de resazurina alterou a coloração do meio refletindo-se na leitura dos valores de absorvância de cada poço. Os ensaios foram realizados em duplicado para cada microrganismo até ter sido atingido um triplicado de valores de CMI e CML coincidentes, obtidos de forma independente (culturas de crescimento independente). Os valores de CMI e de CML foram visualizados a olho nu, por turvação do meio ou pôr alteração da cor da solução à qual foi adicionada resazurina, e em comparação com os controlos positivos crescimento dos microrganismos em meio de cultura sem adição de óleo essencial, máximo crescimento do microrganismo) e negativos (meio de cultura e óleo essencial na respetiva concentração em teste).

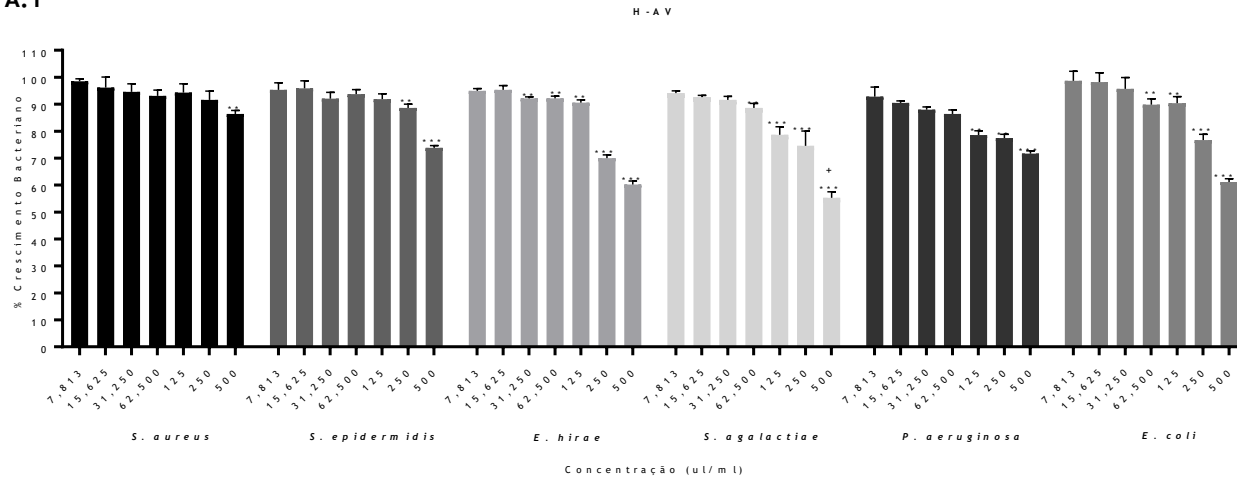
3.3. Resultados e Discussão

A atividade antimicrobiana, antibacteriana e antifúngica, dos hidrolatos, H-AV e H-EC, e dos óleos essenciais, OE-AV e OE-EC, de *C. ladanifer* é avaliada e discutida neste capítulo. Para isso, é analisado o comportamento de oito estirpes de microrganismos, incluindo seis bactérias e dois fungos, na presença destes extratos e feita uma relação com a composição química dos mesmos.

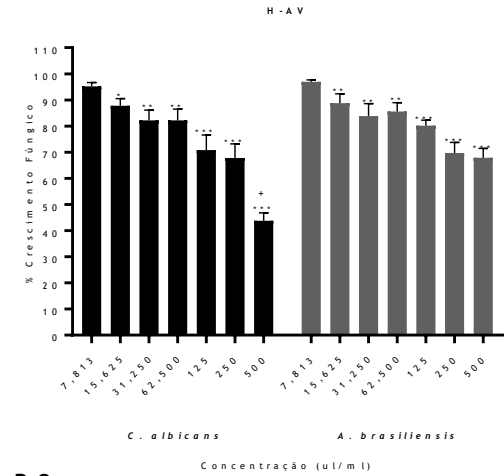
Por observação direta da placa, nos ensaios aos hidrolatos, o *S. agalactiae* e a *C. albicans* foram os únicos microrganismos que obtiveram uma inibição total dos seus crescimentos, observável pela ausência de turvação do meio presente nos poços em teste para a concentração de 500 µl/ml de extrato (CMI = 500 µl/ml). Assim, e não sendo possível analisar a atividade antimicrobiana dos hidrolatos por interpretação de valores de CMI, para os restantes microrganismos foram lidas as absorvâncias das soluções dos poços e convertidas em valores de percentagem de crescimento microbiano. Os gráficos 1: A.1 e A.2, e gráficos 1: B.1 a B.2, apresentam, respetivamente, o perfil do crescimento bacteriano e fúngico, para os microrganismos em estudo, na presença das diferentes concentrações em teste de H-AV e H-EC (7,813 - 500 µl/ml), respetivamente.

Contrariamente, para os óleos essenciais, foi possível observar inibição total do crescimento microbiano de todos os microrganismos em estudo, para a gama de concentrações em teste e por observação direta da placa. Desta forma, a análise da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais foi conseguida através da interpretação de valores de CMI, obtidos pela verificação da ausência de turvação, para o OE-AV, ou pela alteração da cor, pelo método da resazurina, para o OE-EC, dos meios presentes nos poços, e através da interpretação dos valores de CML, obtidos pela observação do crescimento das suspensões de cada poço da placa onde não se verificou crescimento microbiano. A tabela 14 apresenta os valores de CMI e de CML para o respetivo óleo essencial em teste (OE-AV e OE-EC), para os microrganismos em estudo.

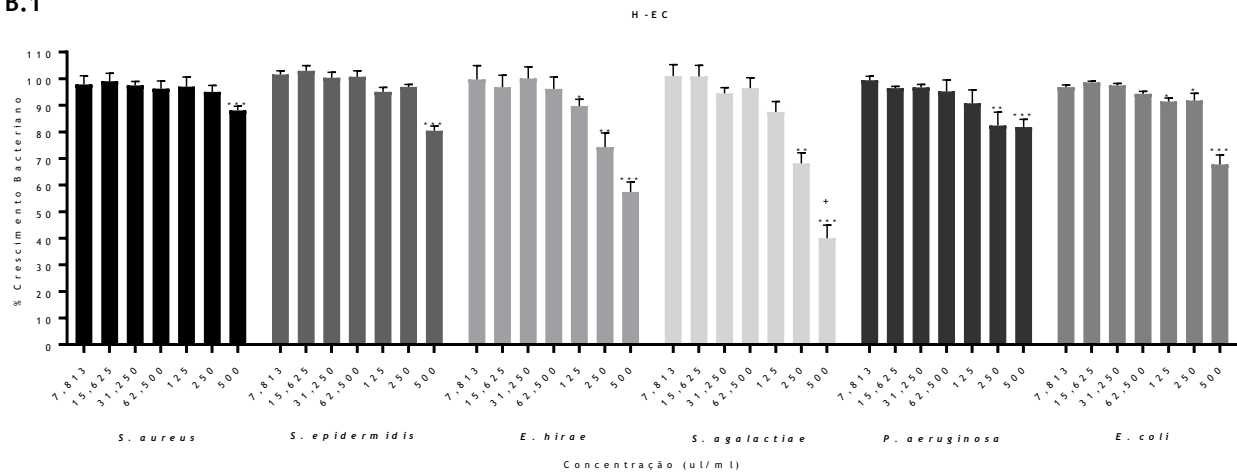
A.1



A.2



B.1



B.2

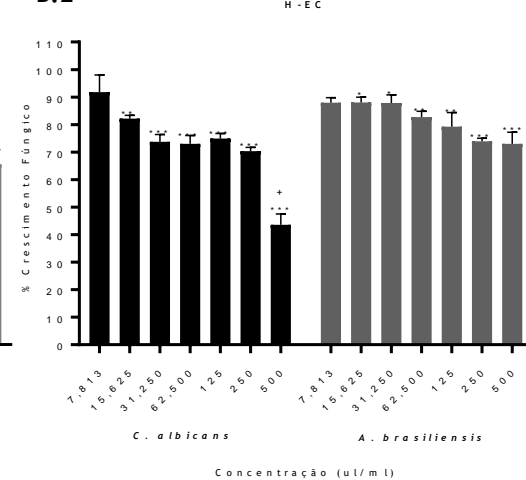


Gráfico 1 - Representação gráfica da percentagem de crescimento bacteriano e fúngico, após exposição, de respetivamente 24h ou 48h, a diferentes concentrações (µl/ml) de H-AV e de H-EC. Os resultados são apresentados com medição ± SEM e foram normalizados ao controlo positivo (crescimento microbiano na ausência de hidrolato), onde foi considerado 100% de crescimento. Foi realizada a análise estatística T-Test. * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001. A concentração mínima capaz de inibir o crescimento microbiano (CMI) foi assinalada com +.

Tabela 14 - Valores de CMI ($\mu\text{l/ml}$) e CML ($\mu\text{l/ml}$) de OE-AV e de OE-EC, para oito estirpes de microrganismos, para a análise da atividade antimicrobiana do OE-AV e do OE-EC.

Espécie de bactéria	Estirpe	OE-AV		OE-EC	
		CMI ($\mu\text{l/ml}$)	CML ($\mu\text{l/ml}$)	CMI ($\mu\text{l/ml}$)	CML ($\mu\text{l/ml}$)
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	16	16	16	32
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 178970	2	8	8	32
<i>Enterococcus hirae</i>	ATCC 179954	32	64	64	128
<i>Streptococcus agalactiae</i>	ATCC 181324	4	16	64	>128
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027	8	16	128	128
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	16	16	128	128
Espécie de fungo	Estirpe	CMI ($\mu\text{l/ml}$)	CML ($\mu\text{l/ml}$)	CMI ($\mu\text{l/ml}$)	CML ($\mu\text{l/ml}$)
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	4	8	4	8
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC 16404	16	>64	0,5	>128

*Para o fungo filamentosso *Aspergillus brasiliensis*, as concentrações de OE-EC em teste (2-128 $\mu\text{l/ml}$) não estavam a abranger os valores de CMI visual, pelo que para este microrganismo houve a necessidade de se adaptar a metodologia de forma a encontrar a concentração pretendida.

Por observação direta da placa de 96 poços para os ensaios da atividade antimicrobiana dos hidrolatos, a redução visível do crescimento dos microrganismos, pela ausência de turvação do meio, apenas foi detetada para o *S. agalactiae* e para a *C. albicans*, para a concentração de 500 $\mu\text{l/ml}$ de hidrolato (CMI = 500 $\mu\text{l/ml}$). Esta concentração não foi, contudo, responsável por causar as suas mortes (CML > 500 $\mu\text{l/ml}$).

Para os restantes microrganismos, não foi possível visualizar diretamente a atividade antimicrobiana de ambos os hidrolatos, já que nenhuma das suas concentrações foi responsável por reduções visíveis dos seus crescimentos. Desta forma, foi feita uma análise à influência das diferentes concentrações de hidrolatos na redução significativa do crescimento dos microrganismos estudados (gráfico 1: A.1, A.2, B.1 e B.2).

Ambos os hidrolatos demonstram ter atividade antimicrobiana para todos os microrganismos em estudo, já que da gama de concentrações de hidrolatos em teste, existe pelo menos uma concentração capaz de reduzir de forma significativa o crescimento destes microrganismos (gráfico 1: A.1, A.2, B.1 e B.2). Desta forma:

- Para ambos os hidrolatos, as estirpes fúngicas, *C. albicans* e *A. brasiliensis*, são mais suscetíveis às suas atividades já que obtêm reduções significativas de crescimento para uma maior gama de concentrações de hidrolato em teste;

- De todos os microrganismos, o *S. aureus* e o *S. epidermidis* são os mais resistentes à atividade antimicrobiana de ambos os hidrolatos, já que a redução significativa dos seus crescimentos apenas ocorre para as concentrações mais altas de hidrolato em estudo;
- O H-AV causa reduções significativas do crescimento bacteriano do *E. hirae*, do *S. agalactiae*, da *P. aeruginosa* e do *E. coli*, para um conjunto de concentrações mais baixas de hidrolato, quando comparado ao H-EC;
- As concentrações de 7,813 µl/ml e de 15,625 µl/ml de H-AV não causam reduções significativas de crescimento para nenhuma das bactérias em estudo;
- As concentrações entre 7,813 µl/ml e 62,500 µl/ml de H-EC não causam reduções significativas de crescimento para nenhuma das bactérias em estudo;
- Para ambos os hidrolatos a redução do crescimento fúngico da *C. albicans* e do *A. brasiliensis* é significativa para todas as concentrações de hidrolatos em estudo, excetuando a de 7,813 µl/ml de ambos os hidrolatos;
- A concentração de 500 µl/ml, foi a única, para ambos os hidrolatos, capaz de reduzir significativamente o crescimento de todos os microrganismos. Na presença do H-AV essa redução foi de pelo menos 15 % (*S. aureus*) e na presença do H-EC de pelo menos 10 % (*S. aureus*).

Desta forma, e ainda que os microrganismos, para os quais a inibição visual de crescimento é total tenham sido os mesmos para ambos os hidrolatos, o H-AV tem uma atividade antimicrobiana superior ao H-EC, já que o total de microrganismos testados apresentam reduções significativas de crescimento para uma maior gama de concentrações de hidrolato em teste.

Por observação direta da placa de 96 poços para os ensaios da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais, a redução visível do crescimento dos microrganismos, pela ausência de turvação do meio, foi detetada para todos os microrganismos testados. Desta forma, a análise da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais é conseguida por interpretação dos valores de CMI e de CML, apresentados na tabela 14.

Para o OE-AV, é possível observar que:

- Os valores de CMI variam entre 2 µl/ml, para o *S. epidermidis*, e 32 µl/ml, para o *E. hirae*, mostrando que, de todas os microrganismos, o *S. epidermidis* é o mais suscetível à atividade antimicrobiana deste extrato e o *E. hirae* é o mais resistente. Para ambos, este extrato exerce um efeito bacteriostático (*S. epidermidis*: CML = 8 µl/ml; *E. hirae*: CML = 64 µl/ml);
- O *S. aureus* e a *E. coli* são as únicas bactérias para as quais este extrato exerce um efeito bactericida (CMI = CML = 16 µl/ml);

- Para o *S. agalactiae* e para a *P. aeruginosa*, o OE-AV exerce um efeito bacteriostático, com o *S. agalactiae* a apresentar um valor menor de CMI (*S. agalactiae*: CMI = 4 µl/ml e CML = 16 µl/ml; *P. aeruginosa*: CMI = 8 µl/ml e CML = 16 µl/ml);
- Para os fungos, a atividade antimicrobiana deste extrato é maior para a *C. albicans* (CMI = 4 µl/ml) do que para o *A. brasiliensis* (CMI = 16 µl/ml), sendo que sobre ambas exerce um efeito fungistático (*C. albicans*: CML = 8 µl/ml e *A. brasiliensis*: CML > 64 µl/ml);
- De todos os microrganismos estudados, o *A. brasiliensis* foi o único para o qual não foi possível determinar a concentração mínima letal de óleo essencial.

Desta forma, a atividade antimicrobiana do OE-AV sobre os microrganismos em estudo, é maior na seguinte ordem: *S. epidermidis* > *S. agalactiae*, *C. albicans* > *P. aeruginosa* > *S. aureus*, *E. coli*, *A. > E. hirae*.

Para o OE-EC, é possível observar que:

- Os valores de CMI variam entre 0,5 µl/ml, para o *A. brasiliensis*, e 128 µl/ml, para a *P. aeruginosa* e para a *E. coli*, mostrando que, de todos os microrganismos, o *A. brasiliensis* é o mais suscetível à atividade antimicrobiana deste extrato, e a *P. aeruginosa* e a *E. coli* os mais resistentes. Para o *A. brasiliensis*, este extrato tem um efeito fungistático (CML > 128 µl/ml) e para a *P. aeruginosa* e para a *E. coli* tem um efeito bactericida (CMI = CML = 128 µl/ml);
- Para o *S. aureus*, mostrou ter um efeito bacteriostático (CMI = 16 µl/ml e CML = 32 µl/ml);
- Para o *S. epidermidis*, este extrato exerce um efeito bacteriostático (CMI = 8 µl/ml e CML = 32 µl/ml);
- Para o *E. hirae* e para o *S. agalactiae* este extrato exerce efeito bacteriostático, com valores de CMI de 64 µl/ml, para ambos, e de CML de 128 µl/ml e superiores a 128 µl/ml, respetivamente;
- Para a *C. albicans*, este extrato, exerce um efeito fungistático (*C. albicans*: CMI = 4 µl/ml e CML = 8 µl/ml);
- De todos os microrganismos estudados, o *S. agalactiae* e o *A. brasiliensis* foram os únicos para os quais não foi possível determinar a concentração mínima letal de óleo essencial.

Desta forma, a atividade antimicrobiana do OE-EC sobre os microrganismos em estudo, é maior na seguinte ordem: *A. brasiliensis* > *C. albicans* > *S. epidermidis* > *S. aureus* > *E. hirae*, *S. agalactiae* > *P. aeruginosa*, *E. coli*.

Comparando ambos os hidrolatos, o H-AV tem uma atividade antimicrobiana superior ao H-EC, já que o total de microrganismos testados apresentam reduções significativas de crescimento microbiano para uma maior gama de concentrações de hidrolato em teste, sugerindo que este tem uma atividade antimicrobiana mais eficaz.

Comparando ambos os óleos essenciais, o OE-AV, no geral, parece ser mais eficaz na inibição do crescimento microbiano dos microrganismos testados, já que as concentrações mínimas, para as quais exerce tal inibição, são menores do que as do OE-EC.

Contudo, diferenças de uma diluição entre concentrações em teste como justificção de eficácia antimicrobiana, parece um pouco forçado dada a natureza pouco discriminativa e muito suscetível a erros dos resultados. Desta forma, para efeitos comparativos, a atividade antimicrobiana dos extratos é estudada como o resultado global da atividade de cada tipo de extrato. Já que a atividade de um extrato depende dos compostos químicos que o constituem, é possível afirmar que os óleos essenciais são constituídos por substâncias com maior atividade antimicrobiana, sobre as estirpes de microrganismos testados, do que os hidrolatos.

Até então, não foram encontrados quaisquer estudos que façam a caracterização química ou que analisem a atividade antimicrobiana de hidrolatos de *C. ladanifer*. Contudo, estudos já realizados com óleos essenciais desta planta, comprovam que existe uma relação entre a composição em compostos pertencentes à família dos terpenos, nomeadamente alfa-pineno, canfeno e acetato de borneol, e a atividade antimicrobiana deste tipo de extrato (28,50).

Desta forma, a composição maioritária destes terpenos em ambos os óleos essenciais, surge como justificção à maior atividade antimicrobiana que estes apresentam sobre os microrganismos em estudo, relativamente à dos hidrolatos.

3.4. Conclusões e Perspetivas Futuras

O ensaio de microdiluições em meio líquido é eficaz para uma primeira avaliação à atividade antimicrobiana de extratos de *C. ladanifer*, já que permite verificar que os óleos essenciais têm maior atividade antimicrobiana, sobre os microrganismos estudados, do que os hidrolatos.

Na presença de ambos os hidrolatos, os microrganismos estudados têm reduções significativas dos seus crescimentos, sendo que estas apenas são visíveis para a mais alta concentração testada, para o *S. agalactiae* e para a *C. albicans*. Esta concentração não é, contudo, responsável por causar as suas mortes.

Para ambos os óleos essenciais, a redução visível do crescimento microbiano é verificada para todos os microrganismos em estudo e a concentração mínima letal de extrato é determinada para a maioria deles.

A comparação destes resultados com a caracterização fitoquímica dos extratos, permite prever que a maior atividade antimicrobiana dos óleos essenciais é da responsabilidade da maior composição e concentração em compostos pertencentes à família dos terpenos, nomeadamente o alfa-pineno, o canfeno e o acetato de borneol, relativamente à composição dos hidrolatos.

Os óleos essenciais surgem, então, como uma opção mais plausível para a utilização como ingredientes conservantes em produtos cosméticos.

Futuramente, poderá ser interessante estudar, isoladamente, a atividade antimicrobiana dos compostos maioritários de ambos os extratos, para avaliar qual a sua contribuição na atividade demonstrada pelo referido extrato.

CAPÍTULO 4

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.1. Considerações Gerais

Estão descritos vários métodos para medir a capacidade antioxidante *in vitro* de amostras, tais como o ensaio da redução do DPPH, o ensaio do radical de óxido nítrico, o ensaio do radical superóxido, entre outros (33,34).

O ensaio da redução do DPPH, técnica realizada no presente estudo, é um método rápido, simples e económico que permite quantificar a capacidade antioxidante de compostos biológicos no estado líquido, utilizando, para isso, o *α*-diphenyl-β-picrylhydrazyl (DPPH). O DPPH é um radical livre estável, de cor púrpura, que produz uma banda de absorção em metanol aos 517 nm e que é adicionado à amostra cujo potencial antioxidante se pretende analisar. O ensaio consiste na medição da capacidade que o agente antioxidante, ou que se suspeita que o seja, tem em reduzir este radical através da doação de um ião de hidrogénio (figura 11). A capacidade da amostra em reduzir o DPPH é evidenciada pela perda gradual da cor púrpura da solução e pelo aparecimento da cor amarela (forma reduzida do DPPH). A capacidade antioxidante do composto em estudo é tanto maior quanto menor for a quantidade de DPPH não reduzido (DPPH inicial), tratando-se assim de um método indireto de avaliação da capacidade antioxidante (35,36).

A interpretação dos resultados é feita pelo valor de concentração do composto que consegue reduzir 50 % da concentração inicial de DPPH (concentração eficiente: EC50), sendo que este é normalizado a um composto cuja atividade antioxidante é conhecida, como o ácido ascórbico. O metanol é o composto utilizado como solvente pois facilita a extração dos compostos antioxidantes da amostra (35,36).

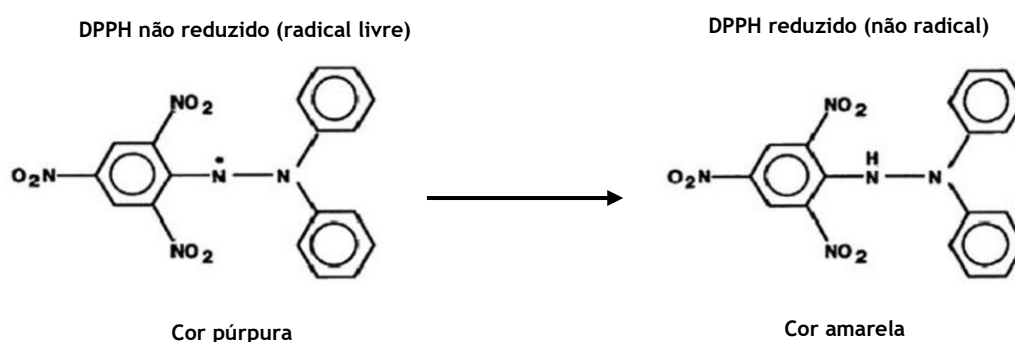


Figura 11 - Reação de redução do DPPH. Adaptado de (36).

4.1.1. Objetivo

Este capítulo tem como objetivo determinar a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos da planta *C. ladanifer*, hidrolato e óleo essencial, através da análise da capacidade que estes têm em reduzir o composto DPPH. Para isso, foi aplicado o ensaio da redução do radical DPPH que permitiu obter os valores de EC50 dos extratos bem como analisar o poder antioxidante dos mesmos.

4.2. Parte Experimental

4.2.1. Materiais e Métodos

4.2.1.1. Reagentes

Foi preparada uma solução de 50 ml de DPPH (Sigma-Aldrich®) a 0,5 mM. Para isso, foi constituída, num *ependorf*, uma solução a partir da dissolução de 0,00985 g de DPPH em 1 ml de metanol, que, posteriormente, foi dissolvida em metanol, num balão volumétrico de 50 ml.

O controlo positivo foi preparado do mesmo modo que o descrito acima, correspondendo a uma solução de 50 ml de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich®) a 0,5 mM, por dissolução de 0,044 g de ácido ascórbico em 1 ml de metanol, num *ependorf*, que foi dissolvida em metanol, num balão volumétrico de 50 ml.

Considerações

As soluções de DPPH e de ácido ascórbico degradam-se quando expostas à luz, desta forma, todo o material utilizado para a sua preparação foi revestido com papel de alumínio. Estas soluções têm a validade de 1 semana, desde que mantidas a 4 °C, e devem ser termostatizadas à temperatura ambiente, quando requerida a sua utilização. De modo a garantir a reprodutibilidade dos resultados, optámos pela preparação extemporânea antes da realização dos ensaios.

4.2.1.2. Determinação da capacidade antioxidante por redução do DPPH

A atividade antioxidante foi determinada pelo método DPPH, através de uma adaptação das metodologias utilizadas por Kedare S. B. e Singh R.P. (2011), Molyneux P. (2004) e Scherer R. e Godoy H. T. (2009) (35,36,86). Este ensaio procedeu-se de igual forma para os extratos em estudo. Para o hidrolato, não foi possível definir uma solução de trabalho para a determinação do EC50 pelo que o ensaio deu-se por concluído neste ponto da metodologia.

A metodologia realizada prevê a inclusão de um controlo positivo, composto para o qual já se encontra descrita a atividade antioxidante, assegurando a correta realização dos procedimentos. Neste estudo, foi selecionado o ácido ascórbico (Vitamina C) (36).

1. Avaliação da capacidade antioxidante da amostra

Para verificar quais as concentrações a incluir na gama de trabalho, foram preparadas diluições sucessivas dos extratos, em *falcons* de 15 ml. Para tal, prepararam-se 5 *falcons* com 9 ml de metanol, sendo que ao primeiro foi adicionado 1 ml do extrato em estudo (diluição 1:10). A partir deste, foram realizadas diluições sucessivas (1:10) adicionando 1 ml da solução do *falcon* anterior ao *falcon* seguinte. Antes de realizadas as diluições, as soluções foram homogeneizadas num agitador vortex. Posteriormente, a cada uma delas, foi retirado 1 ml de solução para um *falcon* previamente revestido com papel de alumínio, num total de 5 *falcons*, aos quais foi adicionado 1 ml da solução de DPPH a 0,5 mM. Estas soluções foram incubadas, durante 1 hora, à temperatura ambiente, permitindo a ocorrência da redução do DPPH pelo extrato.

Findo o período de incubação, foi verificada a ocorrência da redução do DPPH pela amostra através da alteração da cor púrpura da solução (DPPH não reduzido) para amarela (DPPH reduzido) e foi selecionada a gama de trabalho, que corresponde às diluições a partir das quais se observa uma perda gradual da cor púrpura e o aparecimento da cor amarela.

Considerações

O tempo recomendado para a referida incubação é de 30 minutos, contudo, para o óleo essencial, este não foi suficiente para a ocorrência da redução. Desta forma, e segundo as recomendações de Molyneux P. (2004), o tempo deve ser alargado até que a reação ocorra por completo. Se até à diluição 1:100000 (5ª diluição) não se observar a redução do DPPH, deve dar-se continuidade às sucessivas diluições até que seja obtida a diluição para a qual ocorre a primeira redução do DPPH (36).

Para os hidrolatos, nenhuma das 5 diluições da amostra foi capaz de reduzir o DPPH. Desta forma, deu-se continuidade às diluições, até um total de 10 diluições sucessivas (1:10 a 1:10¹⁰), correspondendo às concentrações de 100 µl/ml a 10⁻⁷ µl/ml de hidrolato. A alteração de cor da solução de púrpura para amarela continuou a não ser observável, sendo que o ensaio foi dado como terminado (tabela 15).

Para o OE-EC, a gama de trabalho obtida foi compreendida entre as diluições de 1:10 e de 1:100, correspondendo a 100 µl/ml e a 10 µl/ml de óleo essencial, respetivamente (tabela 15). Embora a diluição de 1:100 corresponda, na gama de trabalho, à solução com a menor

concentração de óleo essencial a reduzir o DPPH, optámos por seleccionar a diluição de 1:10, para a determinação do EC50, evitando, assim, a utilização de uma solução de efeito antioxidante no limite da eficácia.

2. Determinação do EC50

Cada ensaio consistiu na preparação de 3 placas não estéreis de 96 poços, uma para a análise do DPPH, outra para a análise do ácido ascórbico e outra para a análise do OE-EC.

A preparação das placas do ácido ascórbico e do OE-EC diferiu apenas no momento da adição do respetivo composto. Com uma pipeta multicanal, foram adicionados 100 µl de metanol a todos os poços da placa, excetuando aos da coluna 1, onde, aos 6 primeiros (A1-F1), foram adicionados 300 µl de ácido ascórbico a 0,5 mM ou 300 µl da solução da diluição 1:10 do OE-EC, anteriormente determinada. Aos poços G1 e H1 não foi adicionado qualquer tipo de composto. De seguida, com uma pipeta multicanal, foram realizadas diluições sucessivas de 1:1,5, desde os 6 primeiros poços da coluna 1 (A1 a F1) até aos 6 primeiros poços da coluna 12 (A12 a F12), transferindo-se 200 µl da solução do poço anterior para o poço seguinte. Antes da realização da diluição, a solução do poço foi homogeneizada. Desta forma, foi conseguida uma gama de concentrações de ensaio para o OE-EC de 100 µl/ml a 1 µl/ml (tabela 15). Aos poços das linhas A a C foram adicionados 100 µl da solução de DPPH a 0.5 mM. Os poços das linhas G e H serviram de controlo para o metanol.

Para a preparação da placa do DPPH procedeu-se da mesma forma, excetuando o passo da adição do DPPH a 0,5 mM, que não foi realizado. Assim, a placa contém apenas as diluições de DPPH em metanol (poços das linhas A a F) e os controlos de metanol (linhas G e H).

Por fim, as 3 placas foram colocadas a incubar à temperatura ambiente, revestidas em papel de alumínio, durante 1 hora. Após este período, as absorvâncias das soluções dos poços foram lidas a 517 nm, num leitor de microplacas (Biorad, Tokyo Japan).

A tabela 15 apresenta a gama de concentrações em teste para os extratos, hidrolato e óleo essencial.

Tabela 15 - Tabela resumo da gama de concentrações para analisar a atividade antioxidante dos extratos. "Ensaio não realizado" - amostra indisponível para realizar o ensaio.

Extrato	Gama de concentrações (µl/ml)
H-AV	10 ⁻⁷ - 100 (diluições 1:10)
OE-AV	Ensaio não realizado
H-EC	10 ⁻⁷ - 100 (diluições 1:10)
OE-EC	1 - 100 (diluições 1:1.5)

4.2.2. Esquema representativo da metodologia aplicada

As seguintes figuras (figuras 12 a 20) esquematizam a metodologia realizada.

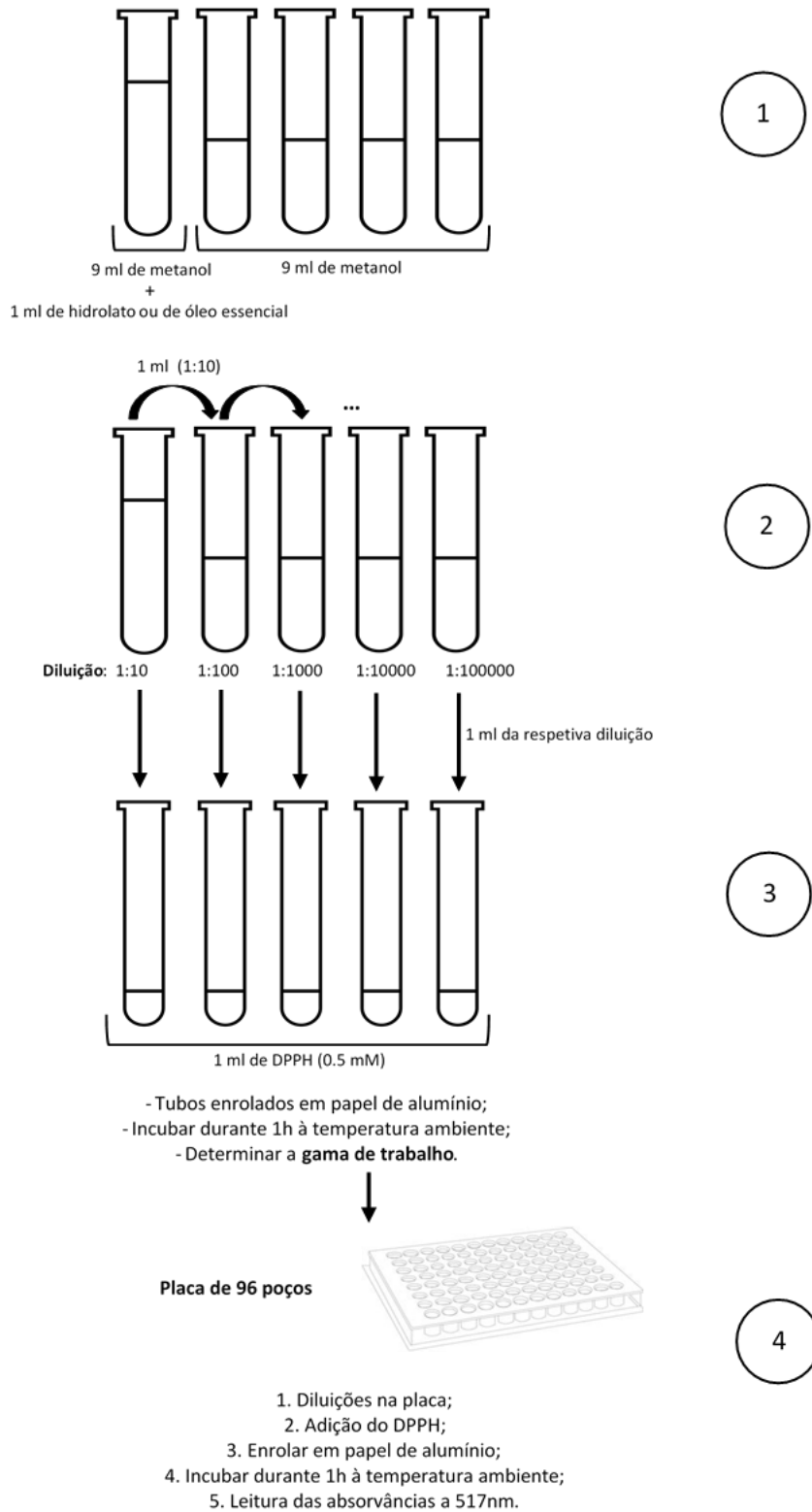


Figura 12 - Esquema representativo da metodologia aplicada para avaliar a capacidade antioxidante dos extratos: preparação da placa de 96 poços para o óleo essencial. Os números representam a ordem de elaboração dos passos.



Figura 13 - Esquema representativo da metodologia aplicada para avaliar a capacidade antioxidante dos extratos: preparação da placa de 96 poços para o ácido ascórbico. Os números representam a ordem de elaboração dos passos.

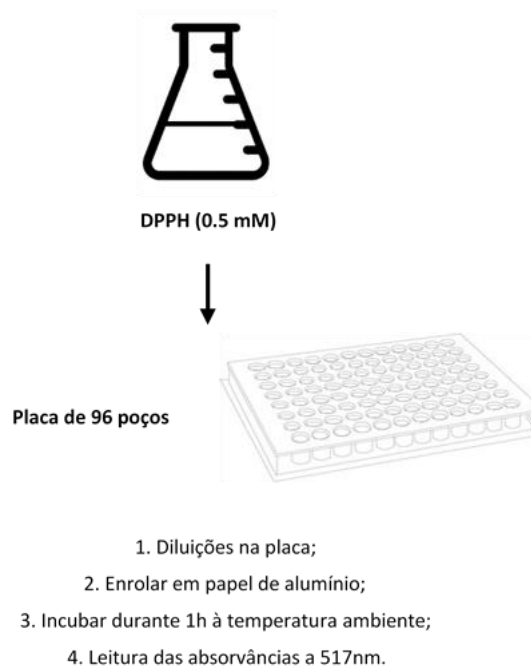


Figura 14 - Esquema representativo da metodologia aplicada para avaliar a capacidade antioxidante dos extratos: preparação da placa de 96 poços para o DPPH. Os números representam a ordem de elaboração dos passos.

Coluna	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Concentração de óleo essencial (µl/ml)											
Linha	100	67	44	30	20	13	9	6	4	3	2	1
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G	-	MetOH	MetOH	MetOH	MetOH	MetOH	MetOH	MetOH	MetOH	MetOH	MetOH	MetOH
H	-	MetOH	MetOH	MetOH	MetOH	MetOH	MetOH	MetOH	MetOH	MetOH	MetOH	MetOH

Figura 15 - Representação esquemática da placa de 96 poços para a determinação do EC50 do óleo essencial, na análise da atividade antioxidante.

Legenda:

- Contorno a negrito representa a placa de 96 poços;
- Espaços a cinzento escuro representam os poços com as diluições do óleo essencial em metanol e DPPH;
- Espaços a cinzento claro representam os poços com apenas as diluições do óleo essencial em metanol;
- Espaços a com a legenda MetOH representam os poços de controlo do metanol.

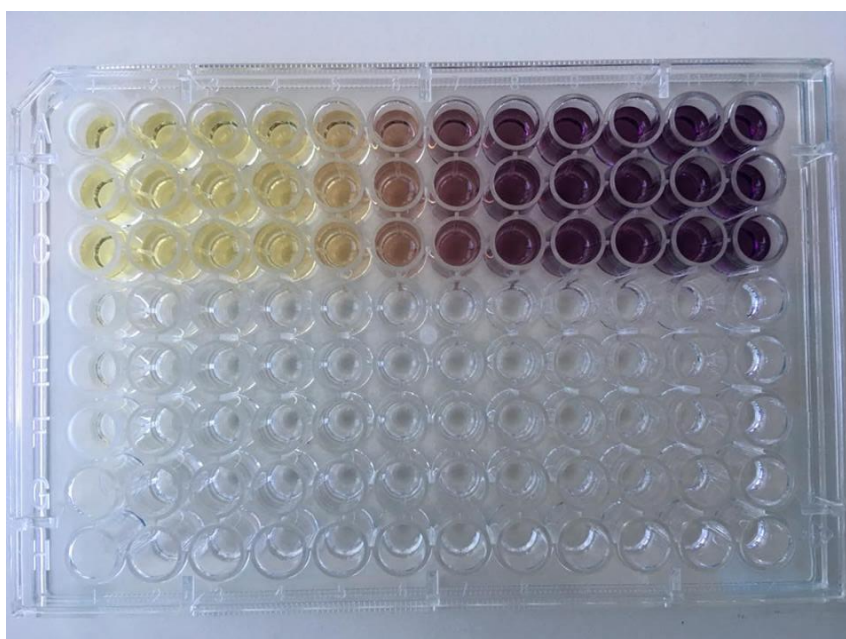


Figura 16 - Fotografia da placa de 96 poços para a determinação do EC50 do óleo essencial, na análise da atividade antioxidante.

Coluna	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Concentração de ácido ascórbico (mM)												
Linha	0,500	0,333	0,222	0,148	0,099	0,066	0,044	0,029	0,020	0,013	0,010	0,006
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G	-	MetOH	MetOH	MetOH	MetOH	MetOH	MetOH	MetOH	MetOH	MetOH	MetOH	MetOH
H	-	MetOH	MetOH	MetOH	MetOH	MetOH	MetOH	MetOH	MetOH	MetOH	MetOH	MetOH

Figura 17 - Representação esquemática da placa de 96 poços para a determinação do EC50 do ácido ascórbico, na análise da atividade antioxidante.

Legenda:

- Contorno a negrito representa a placa de 96 poços;
- Espaços a cinzento escuro representam os poços com as diluições do ácido ascórbico em metanol e DPPH;
- Espaços a cinzento claro representam os poços com apenas as diluições do ácido ascórbico em metanol;
- Espaços a com a legenda MetOH representam os poços de controlo do metanol.

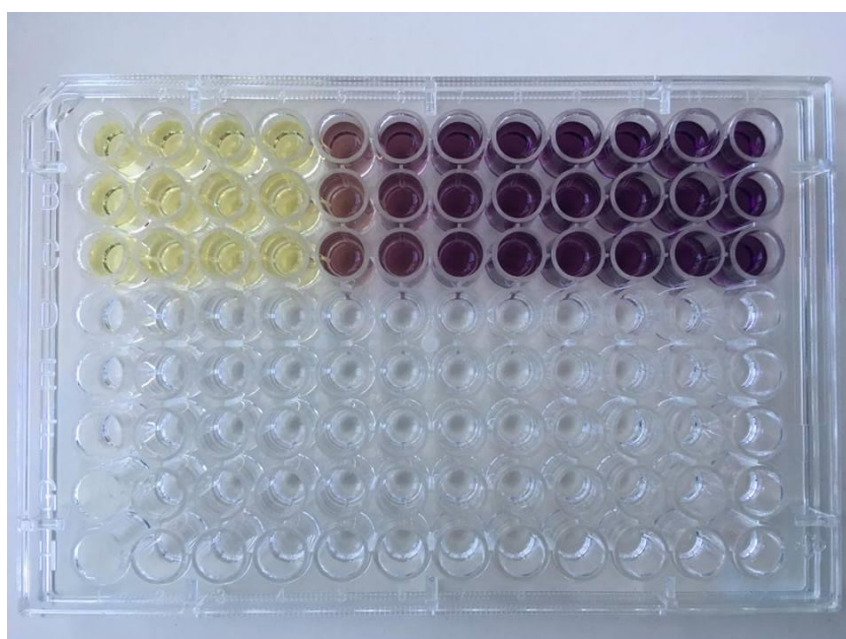


Figura 18 - Fotografia da placa de 96 poços para a determinação do EC50 do ácido ascórbico, na análise da atividade antioxidante.

Coluna	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Concentração de DPPH (mM)												
Linha	0,500	0,333	0,222	0,148	0,099	0,066	0,044	0,029	0,020	0,013	0,010	0,006
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G	-	MetOH	MetOH	MetOH	MetOH	MetOH	MetOH	MetOH	MetOH	MetOH	MetOH	MetOH
H	-	MetOH	MetOH	MetOH	MetOH	MetOH	MetOH	MetOH	MetOH	MetOH	MetOH	MetOH

Figura 19 - Representação esquemática da placa de 96 poços no ensaio do DPPH para a determinação do EC50, na análise da atividade antioxidante.

Legenda:

- Contorno a negrito representa a placa de 96 poços;
- Espaços a cinzento claro representam os poços com apenas as diluições do DPPH em metanol;
- Espaços a com a legenda MetOH representam os poços de controlo do metanol.

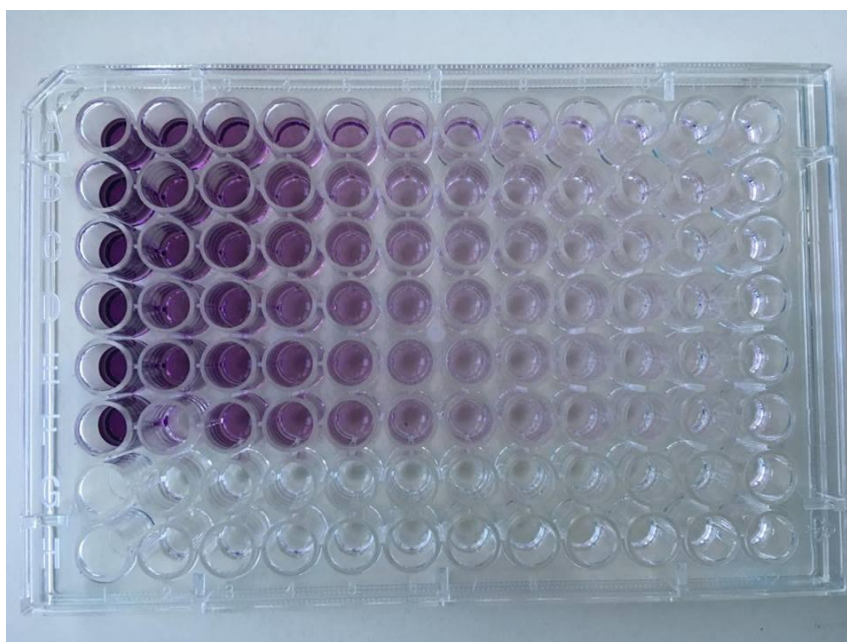


Figura 20 - Fotografia da placa de 96 poços do composto DPPH, na análise da atividade antioxidante.

4.2.3. Tratamento dos resultados

Cada ensaio foi analisado de forma independente, num total de dois ensaios, e tendo em conta as absorvâncias das soluções dos poços das 3 placas, lidas a 517 nm, num leitor de microplacas (Biorad, Tokyo Japan). Em cada foi incluído um triplicado de absorvâncias para cada concentração de composto.

O tratamento e a análise dos resultados foram conseguidos por meio de folhas de cálculo, programadas em Excel (Microsoft Office Professional Plus 2013), onde foram introduzidos os valores das absorvâncias, procedendo-se aos seguintes passos:

1. Construção da reta de calibração do DPPH: Com a média das absorvâncias obtida para as diferentes concentrações de DPPH e com as concentrações de DPPH foi construída a reta de calibração e calculado o declive da mesma. O coeficiente de correlação (R) desta reta foi superior a 0,99 e esta foi construída com um mínimo de cinco valores;
2. Validação do padrão controlo - Determinação do EC50 do ácido ascórbico: A média das absorvâncias das concentrações de ácido ascórbico sem adição de DPPH, foi subtraída à média das absorvâncias das concentrações de ácido ascórbico com adição de DPPH. Procedendo-se, posteriormente, à seguinte ordem de passos:
 - 1.1. Calculou-se a concentração de DPPH que não foi reduzida em cada poço utilizando a equação da reta de calibração do DPPH (construída no passo 1);
 - 1.2. Calculou-se a concentração de DPPH que foi efetivamente reduzida subtraindo os valores obtidos anteriormente (ponto 2.1) a 0,5 mM (concentração inicial de DPPH);
 - 1.3. Calculou-se a percentagem de redução do DPPH, multiplicando a concentração de DPPH, que foi reduzida (ponto 2.2) por 100 e dividindo por 0.5 (concentração inicial de DPPH) e, com estes valores, construída a respetiva equação da reta da % de redução. O coeficiente de correlação (R) desta reta foi superior a 0,95 % e esta foi construída com um mínimo de 4 valores;
 - 1.4. O valor de EC50 do ácido ascórbico foi calculado através da equação da reta da percentagem de redução do DPPH (ponto 2.3).
2. Determinação do EC50 do óleo essencial: Repetiu-se o procedimento descrito no ponto 2 substituindo apenas os valores de absorvância do ácido ascórbico pelos valores de absorvância obtidos para o óleo essencial.

A construção das linhas de tendências, bem como a obtenção dos valores da média e do desvio padrão dos EC50, foram conseguidos a partir de ferramentas matemáticas do programa Excel (Microsoft Office Professional Plus 2013).

4.3. Resultados e Discussão

A atividade antioxidante dos hidrolatos, H-AV e H-EC, e do óleo essencial, OE-EC, de *C. ladanifer* é analisada e discutida neste capítulo, através da capacidade dos extratos em reduzir 50 % da concentração inicial de DPPH (Concentração Eficiente de extrato: EC50) e por comparação com a atividade antioxidante do composto padrão, ácido ascórbico (controlo positivo). Posteriormente, esta atividade é relacionada com as composições químicas dos respetivos extratos.

Para as concentrações em estudo (100 µl/ml a 10⁻⁷ µl/ml), os hidrolatos, H-AV e H-EC, não foram capazes de reduzir o composto DPPH a 0,5 mM no passo inicial da avaliação da capacidade antioxidante, não sendo, conseqüentemente, possível determinar os seus valores de EC50. Desta forma, para as condições em que o estudo foi realizado, estes extratos não têm atividade antioxidante.

Pelo contrário, o OE-EC demonstrou ter atividade antioxidante já que foi capaz de reduzir o composto DPPH a 0,5 mM, no passo inicial da avaliação desta capacidade. Desta forma, foi analisado o seu perfil antioxidante e determinado o valor de EC50.

Os gráficos 2 e 3 apresentam os perfis antioxidantes do OE-EC e do ácido ascórbico, utilizado como padrão de atividade antioxidante (controlo positivo), respetivamente. Estes foram determinados, para cada um dos ensaios através das percentagens de redução do composto DPPH a 0,5 mM na presença de diferentes concentrações dos compostos, e permitiram calcular os respetivos valores de EC50 (tabela 16).

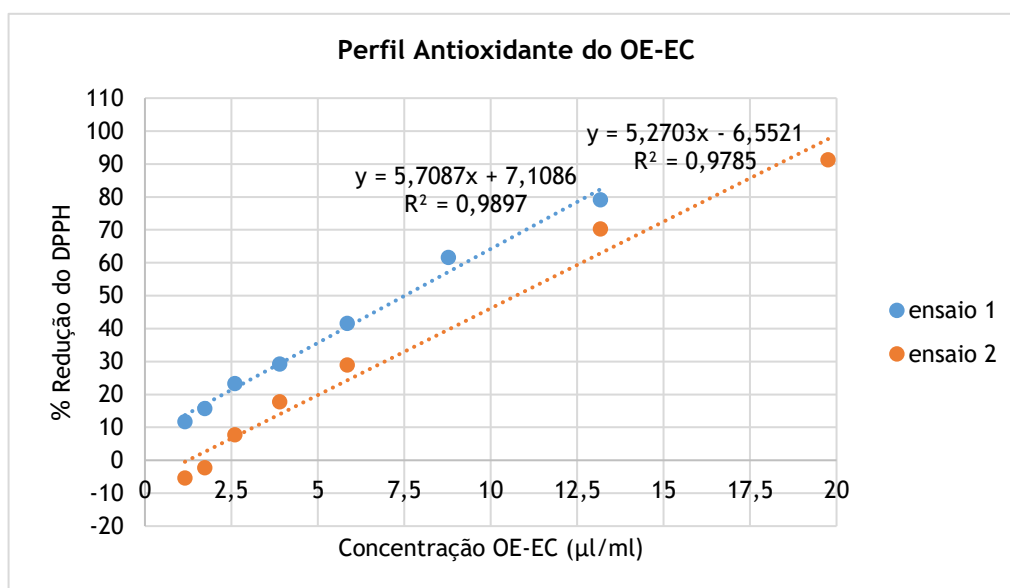


Gráfico 2 - Perfil antioxidante do OE-EC. Percentagens de redução do DPPH (%), para os 2 ensaios realizados, na presença de diferentes concentrações de OE-EC (µl/ml), com as respetivas linhas de tendências. Ensaio 1: $y = 5,7087x + 7,1086$ com $R^2 = 0,9897$; Ensaio 2: $y = 5,2703x - 6,5521$ com $R^2 = 0,9785$.

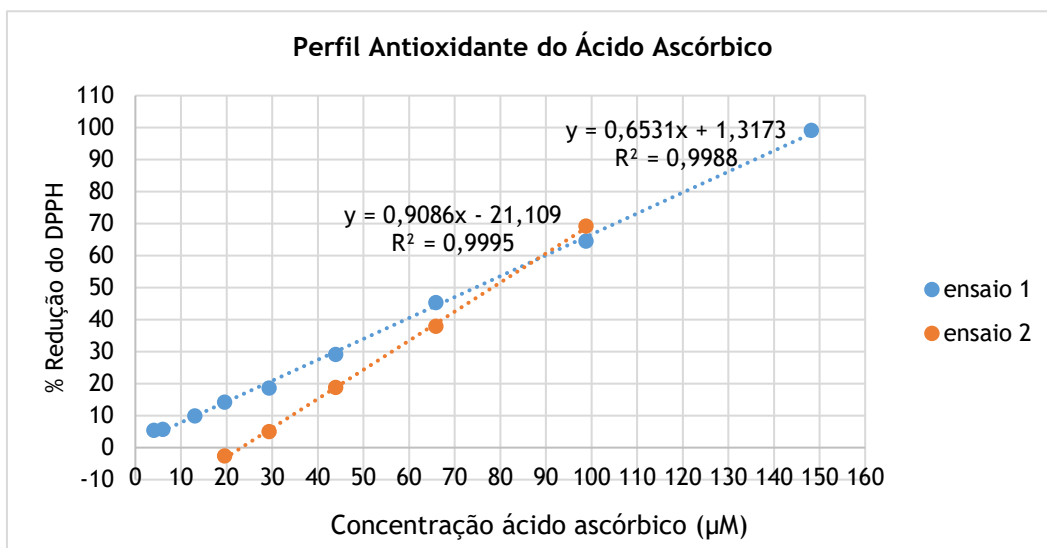


Gráfico 3 - Perfil antioxidante do ácido ascórbico. Percentagens de redução do DPPH (%), para os 2 ensaios realizados, na presença de diferentes concentrações de ácido ascórbico (µM), com as respectivas linhas de tendências. Ensaio 1: $y = 0,6531x + 1,3173$ com $R^2 = 0,9988$; Ensaio 2: $y = 0,9086x - 21,109$ com $R^2 = 0,9995$.

Tabela 16 - Valores de EC50 do OE-EC e do ácido ascórbico.

Ensaio	OE-EC	Ácido Ascórbico	
	EC50 (µl/ml)	EC50 (µM)	EC50 (µg/ml)
1	7,513	74,536	13,127
2	10,730	78,264	13,784
Média	9,122	76,400	13,456
Desvio padrão	2,274	2,636	0,465

O OE-EC apresenta uma atividade antioxidante dependente da dose (gráfico 2), já que a percentagem de redução de DPPH é maior para concentrações mais elevadas de óleo essencial, e a gama de concentrações para as quais a apresenta está compreendida entre 1,15 - 13,17 µl/ml, para o ensaio 1, e 1,15 - 19,75 µl/ml, para o ensaio 2. A concentração, deste óleo, capaz de reduzir 50 % da concentração inicial de DPPH a 0,5 mM (EC50) é de $9,122 \pm 2,274$ µl/ml, como resultado da média dos valores de EC50 dos dois ensaios (tabela 16).

O ácido ascórbico (vitamina E) surge descrito na literatura como um composto padrão largamente utilizado nos ensaios de DPPH, não só por ter uma atividade antioxidante bem definida e estudada, mas por ser um forte agente redutor. Contudo, a sua atividade depende de variáveis como a sua concentração inicial, a concentração inicial de DPPH, o tempo de

reação com o DPPH, o solvente utilizado no ensaio, entre outras. As inúmeras variáveis tornam difícil, por vezes, estabelecer relações entre os diversos estudos (36,87). No presente estudo, para uma concentração inicial de DPPH a 0,5 mM, o ácido ascórbico apresenta atividade antioxidante numa gama compreendida entre 4 - 148 μM (0,7 - 88,69 $\mu\text{g/ml}$), para o ensaio 1, e 19,5 - 98,76 μM (3,43 - 17,39 $\mu\text{g/ml}$), para o ensaio 2, (gráfico 3), e uma média de valores de EC50 de $76,400 \pm 2,636 \mu\text{M}$ ($13,456 \pm 0,465 \mu\text{g/ml}$) (tabela 16).

Ainda que não seja possível obter uma relação direta entre as duas amostras, dada a diferença nas grandezas de medida da concentração, é possível observar que ambas apresentam um perfil antioxidante muito semelhante: a gama para a qual apresentam atividade antioxidante é conseguida para baixos valores de concentração, tal como são os valores de concentração necessários para a redução de 50 % da concentração inicial de DPPH. Como a atividade antioxidante de um extrato é tanto maior quanto menor for o seu valor de EC50, é possível afirmar que o OE-EC tem uma potente atividade antioxidante. Para além disso, a capacidade demonstrada pelo OE-EC em reduzir o DPPH assemelha-se à do ácido ascórbico, o que sugere que este tipo de extrato apresenta na sua constituição bons agentes antioxidantes.

Já que a atividade de um extrato é definida pelos compostos que o constituem, existe uma relação entre a presença de compostos com propriedades antioxidantes nos óleos essenciais e a sua respetiva ausência ou diminuta concentração nos hidrolatos.

O OE-EC é rico em compostos pertencentes à família dos terpenos, como o alfa-pineno, o canfeno e o acetato de borneol, que não surgem na constituição dos hidrolatos. Ainda que os hidrolatos sejam constituídos por compostos pertencentes à família dos terpenos, cujo efeito sinérgico se sobrepõe ao efeito do composto maioritário, apresentam-nos numa concentração menor que os presentes no óleo essencial.

Embora os seguintes estudos demonstrem que a atividade antioxidante de extratos de plantas aromáticas, incluindo-se a *C. ladanifer*, seja maioritariamente da responsabilidade dos compostos fenólicos e flavonoides que os constituem, existem estudos, como o de Zidane H. *et al.* (2012), que demonstram que óleos essenciais, desta planta, ricos em compostos pertencentes à família dos terpenos, apresentam este tipo de atividade. Estes estudos, que procuram relacionar a composição química dos extratos com a atividade antioxidante que apresentam, utilizam o método do DPPH, como um dos métodos de análise desta atividade, embora as metodologias adotadas sejam diferentes.

Zidane H. *et al.* (2012) analisaram a atividade antioxidante do óleo essencial de *C. ladanifer*, bem como a de outros extratos metanólicos desta planta, pelo método do DPPH, utilizando etanol como solvente e o ácido ascórbico como padrão, e caracterizaram, ainda, a composição química do óleo essencial. Concluíram que os extratos metanólicos têm uma atividade antioxidante dependente da dose, semelhante à do ácido ascórbico e mais potente que a do óleo essencial, e que, apresentam ainda uma composição rica em compostos fenólicos. Desta forma, estabeleceram uma relação direta entre a composição em compostos fenólicos e a

atividade antioxidante dos extratos. A caracterização química do óleo essencial permitiu concluir que uma composição em canfeno, borneol, alfa-pineno, e outros terpenos, confere características antioxidantes aos extratos, ainda que não sejam tão potentes como as dos compostos fenólicos (56).

R. Guimarães *et al.* (2010) analisaram o óleo essencial e extratos fenólicos de diferentes plantas aromáticas, pelo método de DPPH, utilizando o metanol como solvente e o BHA e o α -tocoferol, como compostos padrão. Concluíram que, de todos os óleos essenciais em estudo, o de *C. ladanifer* foi o que apresentou maior atividade antioxidante e semelhante à do padrão. Relativamente aos extratos fenólicos, todos apresentaram uma atividade antioxidante superior à dos óleos essenciais da respetiva planta, comprovando que os compostos fenólicos são melhores agentes antioxidantes que os compostos pertencentes à família dos terpenos. Tal atividade é justificada pela facilidade que estes compostos têm em doar átomos de hidrogénio ao composto DPPH. Esta atividade foi, ainda, dependente da dose e mais potente que a dos padrões (34).

M. Amensour *et al.* (2010) analisaram extratos etanólicos e metanólicos de folhas de *C. ladanifer*, pelo método de DPPH, utilizando o metanol como solvente e o ácido ascórbico e o trolox como compostos padrão. Concluíram que os extratos metanólicos apresentaram uma maior atividade antioxidante semelhante à dos compostos padrão e maior que a dos extratos etanólicos. Concluíram, ainda, que estes eram ricos em compostos fenólicos e flavonoides estabelecendo, assim, uma relação direta entre a composição química do extrato e a sua atividade antioxidante (59).

Por fim, D. Andrade *et al.* (2009) analisaram extratos etanólicos e acetanólicos de folhas de *C. ladanifer*, pelo método de DPPH, utilizando o metanol como solvente e o trolox como padrão e comprovaram que o extrato etanólico teve maior atividade antioxidante que o extrato acetanólico, sendo, inclusivamente, maior que a do próprio composto padrão. Justificaram esta diferença de atividades antioxidantes, com a capacidade do etanol em extrair, especificamente, certos compostos fenólicos (60).

O poder antioxidante do OE-EC pode ser utilizado para capturar as substâncias reativas de oxigénio (ERO), que ocorrem de forma natural e espontânea em células da pele, quando o sistema intrínseco de regulação desta produção não se mostra eficiente. Desta forma, e como a este fenómeno está associado o envelhecimento da pele, este extrato surge como um ingrediente potencialmente atrativo para ser utilizado em produtos cosméticos de anti-envelhecimento.

4.4. Conclusões e Perspetivas Futuras

O ensaio do DPPH mostrou-se eficaz para uma primeira avaliação da capacidade antioxidante dos extratos de *C. ladanifer*, já que permitiu verificar que os óleos essenciais têm maior atividade antioxidante do que os hidrolatos.

Os hidrolatos, H-AV e H-EC, pelo método do DPPH, para as concentrações de 10^{-7} µl/ml a 100 µl/ml não demonstraram atividade antioxidante nas condições em que o estudo foi realizado.

O OE-EC demonstrou ter uma potente atividade antioxidante para uma baixa concentração de óleo (EC₅₀ = 9,122 µl/ml), devido à sua composição maioritária em terpenos que não estão presentes na constituição dos hidrolatos.

O presente estudo vem suportar a ideia de que extratos de *C. ladanifer*, nomeadamente os óleos essenciais, são uma boa fonte de agentes antioxidantes naturais, com potencial utilização como ingredientes ativos em produtos cosméticos de anti-envelhecimento.

Futuramente, para análises de hidrolatos, poderá ser interessante:

- Diminuir a concentração inicial de DPPH, facilitando a sua redução pelo hidrolato.

E, para análises de óleos essenciais, poderá ser interessante:

- Estudar, isoladamente, a atividade antioxidante dos seus compostos maioritários, para avaliar qual a sua contribuição na atividade demonstrada pelo referido extrato.

CAPÍTULO 5

ATIVIDADE CITOTÓXICA

5.1. Considerações Gerais

Atualmente, existem vários métodos para testar a citotoxicidade *in vitro* de uma amostra, incluindo-se nestes os métodos de incorporação do vermelho neutro (NRU), de MTT e de XTT (88,89).

O ensaio de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT - *Microculture Tetrazolium Assay*), realizado no presente estudo, permite avaliar, *in vitro*, a citotoxicidade de compostos em células cultivadas. O MTT é um sal de tetrazólio amarelo, solúvel em água que é convertido, por enzimas presentes nas mitocôndrias, num composto roxo insolúvel, o formazano (figura 21). Os cristais de formazano formados são impermeáveis às membranas celulares, acumulando-se no interior células. Assim, este ensaio é conseguido através da leitura das absorvâncias dos cristais de formazano, após solubilização em DMSO. A quantidade de formazano assim medida é diretamente proporcional ao número de células metabolicamente viáveis, em cultura, sendo, por isso, um método indireto (88,89).

Estes resultados são avaliados comparativamente ao controlo negativo e refletem-se em valores de índice de citotoxicidade (IC). O IC₅₀ indica o valor da concentração de extrato capaz de inibir 50 % da viabilidade celular das linhas celulares em estudo (88).

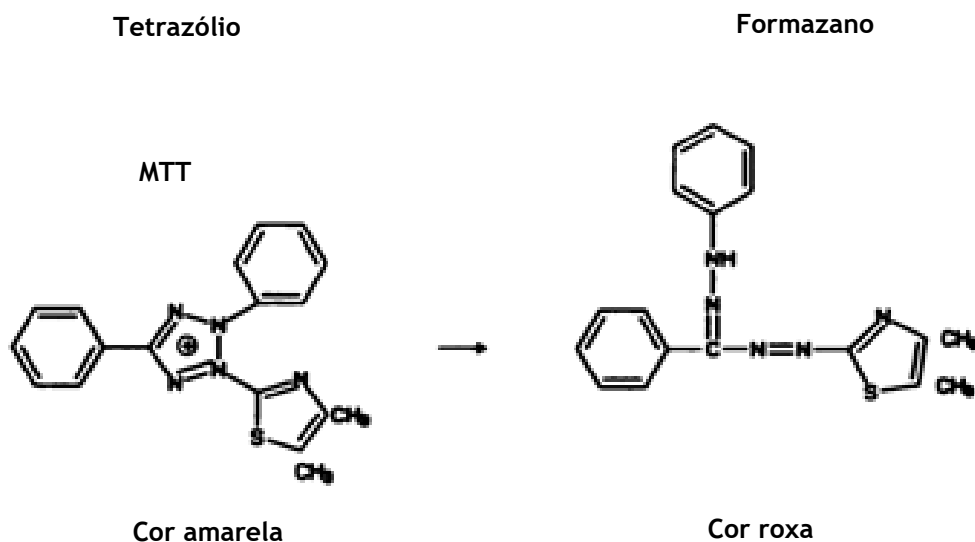


Figura 21 - Conversão do composto tetrazólio no composto formazano. Imagem adaptada de (88).

5.1.1. Objetivo

Este capítulo tem como objetivo determinar a atividade citotóxica *in vitro* dos extratos da planta *C. ladanifer*, hidrolato e óleo essencial, em linhas celulares da pele: fibroblastos e queratinócitos, através do ensaio colorimétrico MTT, detalhado na ISO/EN 10993-5. Os valores de IC50, dos extratos, foram obtidos para cada uma das linhas celulares em estudo.

5.2. Parte Experimental

5.2.1. Materiais e Métodos

5.2.1.1. Células

Para a análise da atividade citotóxica de ambos os extratos, hidrolato e óleo essencial, foram incluídas duas linhas celulares da pele: fibroblastos, linha celular 3T3 (ATCC-CRL-1658) representativa da derme, e os queratinócitos, linha celular HaCat (ATCC-CCS-300493) representativa da epiderme.

Ambas as linhas celulares foram cultivadas em meio DMEM suplementado com glucose, bicarbonato de sódio, penicilina e estreptomicina. As culturas foram repicadas em cada dois dias (48 horas), ou sempre que se mostraram confluentes, e mantidas em estufa a 37 °C, com 95 % de humidade do ar contendo 5 % de CO₂.

Ambas as linhas celulares foram utilizadas, para os ensaios, entre as passagens 38 a 41.

5.2.1.2. Reagentes

O meio DMEM (Life technologies) suplementado com 25 mM de glucose (Sigma-Aldrich®), 35,9 mM de bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich®), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich®), será referido, nesta dissertação, como “meio completo” e foi utilizado como meio de cultura para as células.

O azul tripano (Merk®) foi utilizado para marcar células vivas para contagem a câmara de Neubauer.

O composto metiltiazolildifenil-tetrazolio bromido (MTT) (Alfa Aesa®), foi utilizado para medir a viabilidade celular.

O composto dimetilsulfoxido (DMSO) (FisherChemical), foi utilizado para solubilizar os cristais de formazano formados e como solvente do OE-EC.

5.2.1.3. Determinação da Citotoxicidade *in vitro*: Ensaio MTT

A atividade citotóxica dos extratos em fibroblastos e queratinócitos da pele foi determinada *in vitro* de acordo com o ensaio de MTT descrito na ISO/EN 10993-5 - *Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*.

1. Tratamento das células e preparação da placa de 96 poços

As células previamente cultivadas em meio completo e em frascos de cultura de 75 cl, foram utilizadas para o ensaio assim que se mostraram confluentes. Para isso, o meio completo, do frasco de cultura, foi descartado e foram adicionados 5 ml de uma solução de tripsina-EDTA a 0,25 % (w/v), que atuou sobre as células até estas se soltarem consideravelmente da parede do frasco. De seguida, foram adicionados 5 ml de meio completo para neutralizar a atividade da tripsina, formando uma mistura de células, meio completo e tripsina, que foi transferida para um *falcon* de 15 ml e levada a centrifugar a 1400 rpm, durante 5 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi removido e o *pellet* de células, visivelmente depositado no fundo do *falcon*, foi ressuspensionado em 8 ml de meio completo. Desta ressuspensão celular, foram retirados 10 µl para um *ependorf* e adicionados 10 µl de azul tripano, servindo de marcação das células viáveis para contagem na câmara de *Neubauer*. A concentração de células viáveis por ml de solução foi conseguida a partir da seguinte equação (1):

$$\text{Concentração de células } \left(\frac{\text{células}}{\text{ml}} \right) = \text{média das células de cada quadrante} \times 2 (\text{fator de diluição}) \times 10^4 \quad (1)$$

Com o valor de células por ml de solução, a suspensão celular foi diluída em meio completo para que cada poço da placa de 96 poços contivesse 1×10^4 células, após lhes serem adicionados 200 µl desta solução.

Numa placa estéril de 96 poços (Orange Scientific), para além dos poços reservados para as concentrações de hidrolato e óleo essencial em teste, foram, ainda, reservados 5 poços para controlos negativos (células e meio completo, representado 0 % de citotoxicidade).

Assim, em cada poço da placa, foram colocados 200 µl da solução de células, preparada anteriormente, e a placa foi colocada a incubar (estufa, NUAIRE, DHD AUTOFLOW, CO₂ Air-Jacketed Incubator) durante 24 horas, a 37 °C, com 95 % de humidade do ar contendo 5 % de CO₂, permitindo a adesão das células ao fundo do poço.

2. Preparação dos estímulos e estimulação das células

- **Hidrolato**

O hidrolato, por ser um composto aquoso, não necessita de um solvente que assegure a sua solubilização em meio completo.

As concentrações de hidrolato (tabela 17), H-AV e H-EC, foram preparadas em *falcons* de 15 ml através de diluições sucessivas de 1:2, fazendo um total de 6 concentrações em teste (15,625 a 500 µl/ml). Aos *falcons* foram adicionados 1,2 ml de meio completo e ao primeiro foram, ainda, adicionados 1,2 ml de hidrolato. As diluições sucessivas iniciaram-se no primeiro *falcon* e antes de realizadas as soluções foram homogeneizadas no agitar vortex. Estes valores foram ajustados para que cada *falcon* contivesse um volume de solução suficiente que permitisse colocar 200 µl em cada poço da placa, reservado para a respetiva concentração a testar.

Após o período de incubação e da preparação dos estímulos, o meio completo foi removido de cada poço e descartado com cuidado para que as células permanecessem aderidas ao fundo. Aos poços reservados, foram adicionados 200 µl dos respetivos estímulos e aos poços de controlo foram adicionados 200 µl de meio completo. A placa foi colocada a incubar (estufa, NUAIRE, DHD AUTOFLOW, CO₂ Air-Jacketed Incubator) durante 24 horas a 37 °C, com 95 % de humidade do ar contendo 5 % de CO₂.

- **Óleo Essencial**

O ensaio de compostos oleosos em meios aquosos pressupõe a estabilização da emulsão do óleo em água, pelo que é necessário adicionar um emulsionante ou um solvente ao meio de cultura que assegure a solubilização do óleo essencial durante todo o ensaio. Um dos agentes emulsionantes normalmente utilizado é o DMSO (83), desta forma, foi necessário encontrar a concentração máxima tolerada pelas células e que, ao mesmo tempo, fosse eficaz a emulsionar o óleo essencial no meio de completo. No anexo 5, encontram-se os ensaios realizados para a validação e posterior implementação do método com a utilização deste composto como emulsionante do OE-EC.

Em solução, o DMSO tem de estar na mesma proporção que o OE-EC, assim foram preparadas soluções de estímulos independentes entre si com o DMSO a 1, 0,8, 0,4, 0,2, 0,1 e 0,05 %, correspondentes, respetivamente, às concentrações de OE-EC em teste: 10, 8, 4, 2, 1 e 0,5 µl/ml (tabela 17). Assim, de um meio completo aditivado com DMSO a 1 % foram realizadas diluições, formando soluções de meio completo com o DMSO nas percentagens indicadas, que foram, posteriormente, utilizadas para formar as soluções com OE-EC utilizadas como estímulos dos ensaios. As soluções de estímulos foram preparadas em *falcons* de 15 ml, para um volume total suficiente para colocar 200 µl em cada poço da placa reservado para a respetiva concentração em teste. Os *falcons* foram levados ao agitador vortex antes das respetivas soluções serem adicionadas à placa.

Após o período de incubação e da preparação dos estímulos, o meio completo foi removido de cada poço e descartado com cuidado para que as células permanecessem aderidas ao fundo. Aos poços reservados, foram adicionados 200 µl dos respectivos estímulos e aos poços de controlo foram adicionados 200 µl de meio completo. A placa foi colocada a incubar (estufa, NUAIRE, DHD AUTOFLOW, CO₂ Air-Jacketed Incubator) durante 24 horas a 37 °C, com 95 % de humidade do ar contendo 5 % de CO₂.

3. Execução do ensaio MTT

Após o período de incubação das células com os estímulos, foram adicionados, no escuro, 20 µl do composto MTT a cada poço de ensaio e de controlo, e, posteriormente, a placa foi colocada a incubar (estufa, NUAIRE, DHD AUTOFLOW, CO₂ Air-Jacketed Incubator), revestida em papel de alumínio, durante 4 horas a 37 °C, com 95 % de humidade do ar contendo 5 % de CO₂.

Após este período de incubação, a solução de cada poço foi removida e descartada com cuidado para que as células permanecessem aderidas ao fundo e foram adicionados 200 µl de DMSO que foram ressuspendidos, com uma pipeta multicanal, para promover a dissolução dos cristais de formazano. Por fim, as absorvâncias foram lidas a 570 nm e 690 nm, no leitor de microplacas (Biorad, Tokyo Japan).

Tabela 17 - Tabela resumo das concentrações utilizadas para testar a atividade citotóxica dos extratos. "Ensaio não realizado" - amostra indisponível para realizar o ensaio.

Extrato	Gama de concentrações em teste (µl/ml)
H-AV	15,625 - 500 (diluições 1:2)
OE-AV	Ensaio não realizado
H-EC	15,625 - 500
OE-EC	0,5, 1, 2, 4, 8 e 10

5.2.2. Esquema representativo da metodologia aplicada

As seguintes figuras (figuras 22 a 24) esquematizam a metodologia realizada.

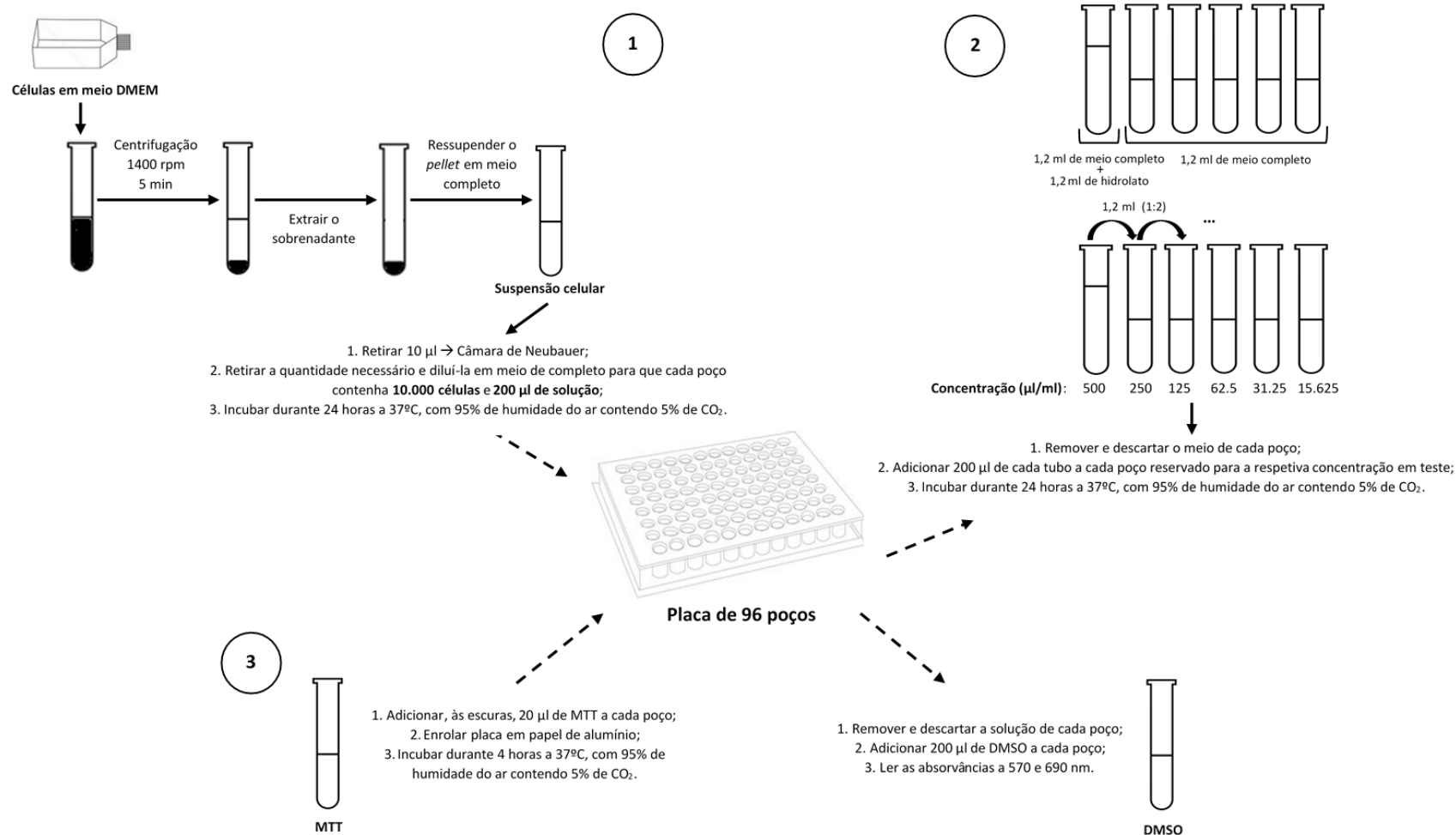


Figura 22 - Esquema representativo da metodologia aplicada na execução do ensaio MTT para avaliação da atividade citotóxica do extrato hidrolato. Os números representam a ordem de elaboração dos passos. As setas a tracejados estão orientadas para a adição ou extração de soluções na placa de 96 poços. Adaptar a metodologia para o óleo essencial.

Coluna		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
		Concentração (µl/ml)											
Linha	n	CRL-		500	250	125	62,5	31,25	15,625				
A													
B	1												
C	2												
D	3												
E	4												
F	5												
G													
H													

Figura 23 - Representação esquemática da placa de 96 poços no ensaio MTT para os hidrolatos.

Coluna		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
		Concentração (µl/ml)											
Linha	n	CRL-		10	8	4	2	1	0,5				
A													
B	1												
C	2												
D	3												
E	4												
F	5												
G													
H													

Figura 24 - Representação esquemática da placa de 96 poços no ensaio MTT para o OE-EC.

Legenda:

- Contorno a negrito representa a placa de 96 poços;
- Espaços a cinzento claro representam os controlos negativos (CRL -): poços (n=5) com células e meio completo;
- Espaços a cinzento escuro representam os ensaios em teste: poços (n=5) com células e respetivo estímulo.

5.2.3. Tratamento dos resultados

Um ensaio (uma placa) consistiu na análise do comportamento de uma linha celular na presença de um extrato. Em cada ensaio foram realizadas 5 repetições (n=5 poços) para as concentrações de extrato em teste e para os controlos negativos. Foram realizados 2 ensaios independentes para cada linha celular e para cada extrato.

Os resultados foram analisados em conjuntos de 2 ensaios independentes referentes à mesma linha celular e ao mesmo extrato em estudo.

O tratamento dos resultados foi conseguido por meio de folhas de cálculo programadas em Excel (Microsoft Office Professional Plus 2013) e por meio da análise estatística (T-TEST) realizada no programa GraphPad Prism (versão 7.03 para Windows, GraphPad Software, La Jolla Califórnia, EUA), e consistiu nos seguintes passos:

1. Absorvâncias: Os valores de absorvância medidos 570 nm, para cada concentração teste e para cada controlo, foram subtraídos aos respetivos valores de absorvância medidos a 690 nm;
2. Calcular a percentagem de viabilidade celular: Cada valor de absorvância obtido no ponto anterior (ponto 1) foi multiplicado por 100 e dividido pela média dos valores de absorvância obtidos no ponto anterior (ponto 1). Estes valores representam a percentagem de viabilidade celular residual;
3. Construção da curva de tendências da viabilidade celular: Foi calculada a média dos valores de percentagem de viabilidade celular obtidos para cada concentração de composto (ponto 2) e, com estes e com as concentrações de extrato em teste, foi contruído um diagrama de dispersão ao qual foi ajustada uma linha de tendências, em Excel. A partir desta linha, foram calculados os valores de IC50.
4. Construção de um gráfico de barras e análise estatística: Com os valores de percentagem de viabilidade celular, obtidos no ponto 2, e com as concentrações de extrato, foi contruído um gráfico de barras, no GraphPad Prism, e feita uma análise estatística T-Test.

5.3. Resultados e Discussão

5.3.1. Ensaio MTT: H-AV e H-EC

A atividade citotóxica dos hidrolatos de *C. ladanifer*, H-AV e H-EC, é analisada e discutida neste capítulo a partir dos perfis de citotoxicidade, obtidos para duas linhas celulares, 3T3 (fibroblastos) e HaCat (queratinócitos), na presença destes extratos, e por comparação dos valores de concentração de extrato capazes de inibir 50 % da viabilidade celular (IC50). Posteriormente, esta atividade é relacionada com a composição química dos respetivos extratos.

A atividade citotóxica é determinada a partir da percentagem de viabilidade celular, de cada linha celular, obtida para cada concentração de hidrolato em estudo (15,625 - 500 µl/ml). Estas percentagens são normalizadas ao controlo negativo (células sem estimulação de hidrolato), onde se obteve o valor máximo de viabilidade celular, 100 %, e quanto menor o seu valor, maior a ação tóxica do respetivo hidrolato. Os gráficos 4 e 5, apresentam a atividade citotóxica do H-AV e H-EC, respetivamente, para as linhas celulares em estudo.

Os valores de IC50 de cada hidrolato, H-AV e H-EC, para cada linha celular, são calculados a partir das linhas de tendências dos perfis de citotoxicidade (gráficos 6 e 7) e estão expostos na tabela 18.

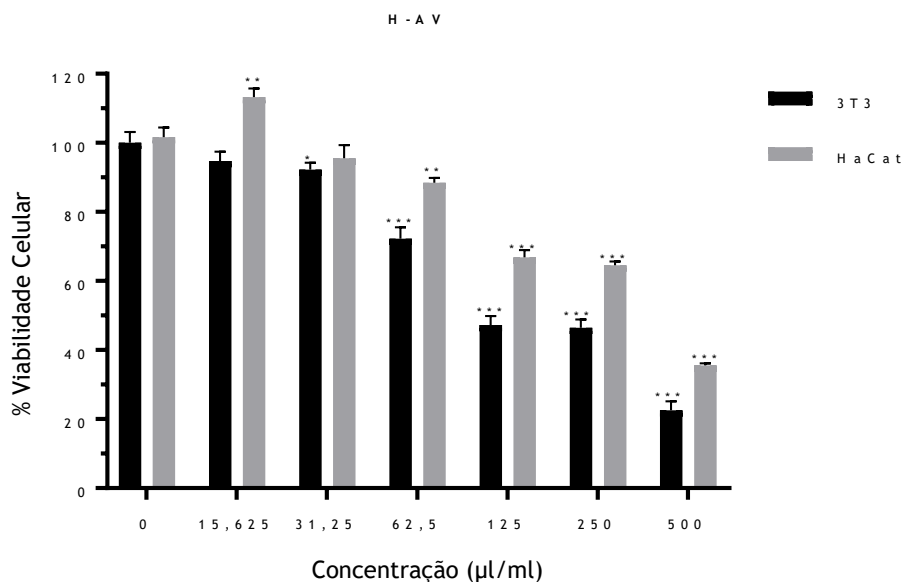


Gráfico 4 - Atividade citotóxica do H-AV para as linhas celulares 3T3 e HaCat, após uma exposição de 24 h a diferentes concentrações (µl/ml) deste extrato. Os resultados são apresentados com medição ± SEM de dois ensaios independentes e normalizados ao controlo negativo (células não estimuladas com hidrolato). Foi realizada a análise estatística T-Test. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, comparativamente com o controlo negativo.

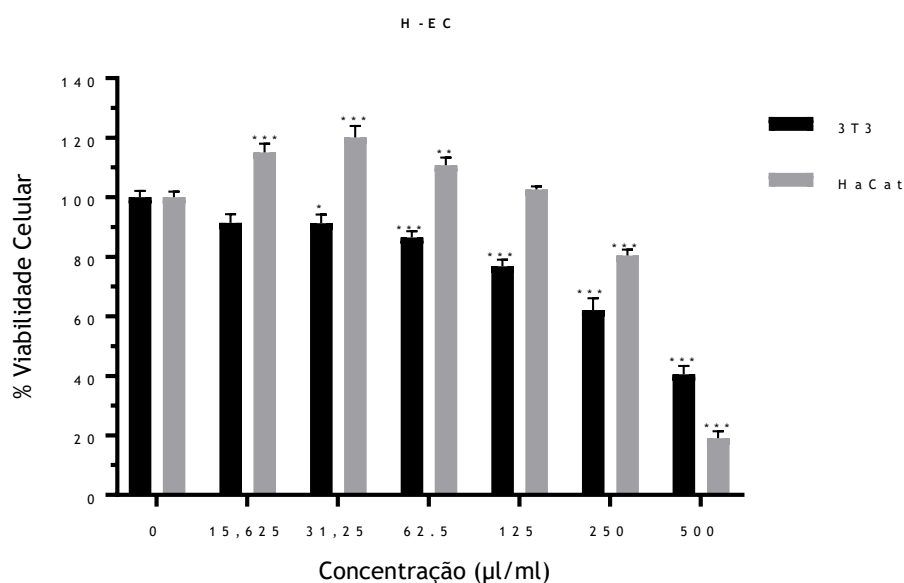


Gráfico 5 - Atividade citotóxica H-EC para as linhas celulares 3T3 e HaCat, após uma exposição de 24 h a diferentes concentrações (µl/ml) deste extrato. Os resultados são apresentados com medição \pm SEM de dois ensaios independentes e normalizados ao controlo negativo (células não estimuladas com hidrolato). Foi realizada a análise estatística T-Test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, comparativamente com o controlo negativo.

A atividade citotóxica do H-AV é semelhante para as duas linhas celulares. Este, é capaz de reduzir de forma significativa a viabilidade celular de ambas as linhas, para a maioria das concentrações em estudo, mostrando ter atividade citotóxica sobre elas. Contudo, este efeito é mais intenso para a linha celular 3T3, já que, para a mesma concentração de hidrolato em estudo, esta apresenta reduções mais significativas de viabilidade celular. No geral, o efeito citotóxico deste hidrolato é dependente da dose para ambas as linhas, com percentagens de viabilidade celular mais baixas para concentrações mais elevadas de hidrolato. A linha celular HaCat, para uma concentração de 15,625 µl/ml de H-AV, apresenta um aumento significativo da percentagem de viabilidade celular, surgindo como a exceção à análise geral do perfil citotóxico deste extrato (gráfico 4).

Para a concentração mais alta testada de H-AV (500 µl/ml), ambas as linhas celulares apresentam uma redução significativa da sua viabilidade celular, quando comparadas com o controlo negativo, com valores de percentagem de viabilidade celular de 20 % ($p < 0.001$), para a linha 3T3, e de 35 % ($p < 0.001$), para a linha HaCat. De todas as concentrações em estudo, esta é única responsável por causar mais de 50 % de inviabilidade celular, para ambas as linhas, sendo, portanto a mais tóxica.

Pelo contrário, a mais baixa concentração testada de H-AV (15,625 µl/ml), não é responsável por uma redução significativa da percentagem de viabilidade celular da linha 3T3, mas é responsável pelo aumento significativo da viabilidade celular da linha HaCat (120 %, $p < 0.01$).

As concentrações de 125 µl/ml e 250 µl/ml de H-AV, exercem igual efeito sobre ambas as linhas celulares, com percentagens de viabilidade celular iguais para ambas as linhas celulares (125 µl/ml: 45 %, $p < 0.001$; 250 µl/ml: 65 %, $p < 0.001$). Para a concentração de 62,5 µl/ml de H-AV, a linha celular 3T3 apresenta valores de viabilidade celular significativamente mais baixos (70 %, $p < 0.001$) do que a linha HaCat (90 %, $p < 0.01$), o que sugere que nesta concentração de hidrolato a linha 3T3 é mais sensível ao seu efeito tóxico. Para a concentração de 31,25 µl/ml de H-AV, apenas a linha 3T3 apresenta uma redução significativa da sua viabilidade celular (90 %, $p < 0.05$).

O H-EC, contrariamente ao H-AV, apresenta uma atividade citotóxica muito diferente para ambas as linhas celulares. Este, é capaz de reduzir de forma significativa, e dependente da dose, a viabilidade celular da linha 3T3, para a maioria das concentrações em estudo, mostrando, desta forma, ter atividade citotóxica sobre esta linha celular. Contudo, para a linha HaCat, as mais baixas concentrações de H-EC aumentam significativamente a percentagem de viabilidade celular desta linha, mostrando ter um efeito maioritariamente estimulador do que citotóxico sobre a sua viabilidade celular (gráfico 5).

A mais alta concentração testada de H-EC (500 µl/ml) é responsável por reduzir de forma significativa a viabilidade celular de ambas as linhas celulares, quando comparadas com o controlo negativo. Contudo, de todas as concentrações de H-EC em teste, esta é a única em que a percentagem de viabilidade celular da linha HaCat (10 %, $p < 0.001$) é menor do que a da linha 3T3 (40 %, $p < 0.001$). Ainda assim, esta concentração é responsável por causar mais de 50 % de inviabilidade celular para ambas as linhas.

Para a concentração de 250 µl/ml de H-EC, ambas as linhas celulares apresentam valores de percentagem viabilidade celular significativamente mais baixos, 60 % ($p < 0.001$), para a linha 3T3, e 80 % ($p < 0.001$), para a linha HaCat, em comparação com o controlo negativo. Já para a concentração de 125 µl/ml, apenas a linha celular 3T3 apresenta uma percentagem de viabilidade celular significativamente mais baixa em comparação ao controlo negativo (80 %, $p < 0.001$).

Para as restantes concentrações de H-EC, 62,5 µl/ml, 31,25 µl/ml e 15,625 µl/ml, a linha celular 3T3 apresenta valores de percentagem de viabilidade celular significativamente mais baixos para as concentrações de 62,5 µl/ml (85 %, $p < 0.001$) e 31,25 µl/ml (90 %, $p < 0.05$), quando comparada com o controlo. Já a linha celular HaCat apresenta um aumento significativo das percentagens de viabilidade celular para valores acima de 100 % do controlo negativo (110 %, $p < 0.001$; 120 %, $p < 0.001$ e 115 %, $p < 0.01$, respetivamente), demonstrando, então, que o H-EC tem um efeito estimulador da viabilidade celular sobre esta linha.

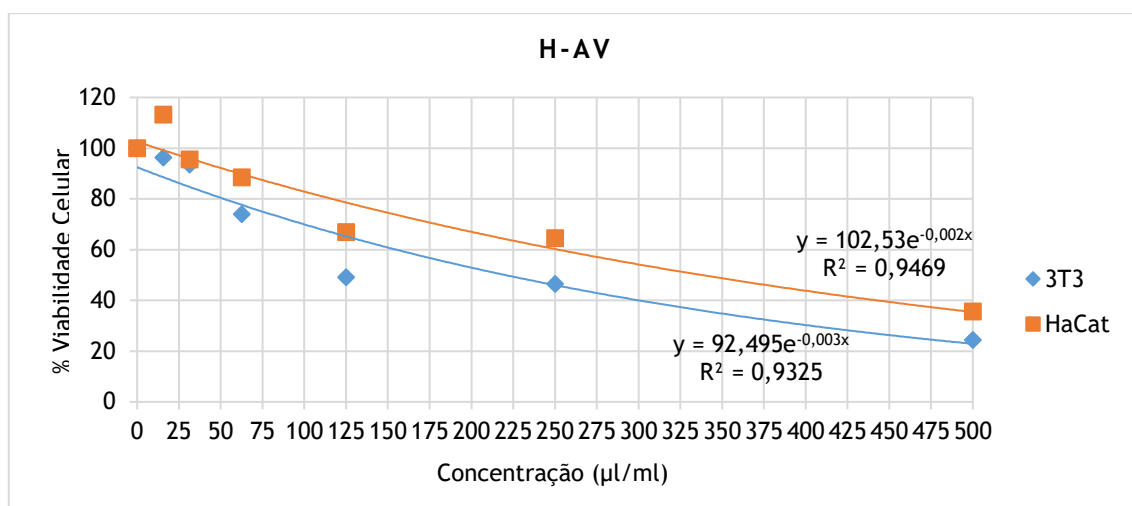


Gráfico 6 - Perfil de citotoxicidade do H-AV, para cada uma das linhas celulares em estudo, e respectivas linhas de tendência utilizadas para determinar o IC50 do H-AV para cada linha celular: 3T3 ($y = 92,495e^{-0,003x}$ com $R^2 = 0,9325$) e HaCat ($y = 102,53e^{-0,002x}$ com $R^2 = 0,9469$).

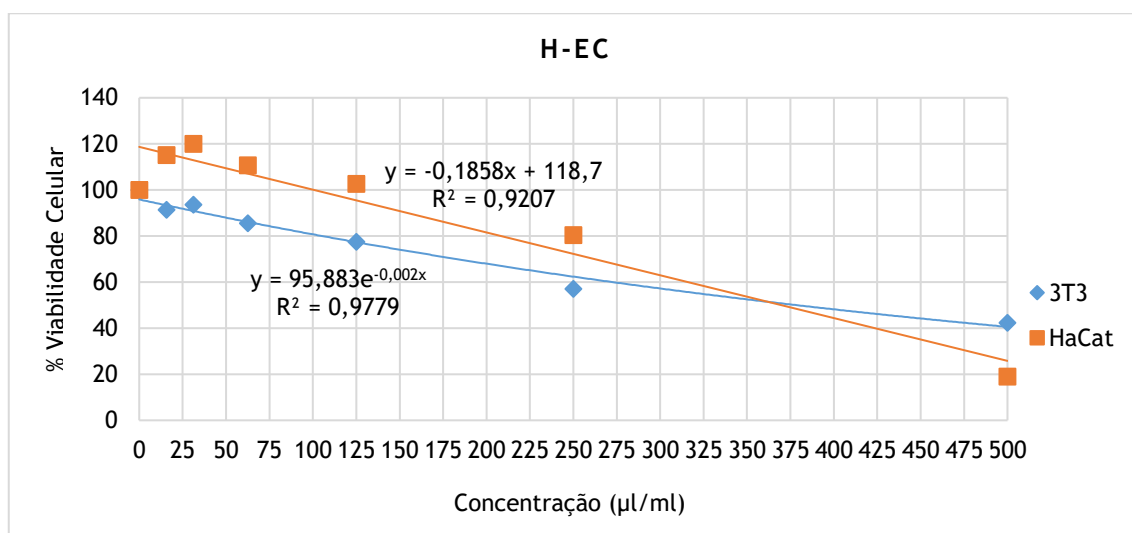


Gráfico 7 - Perfil de citotoxicidade do H-EC, para cada uma das linhas celulares em estudo, e respectivas linhas de tendência utilizadas para determinar o IC50 do H-EC para cada linha celular: 3T3 ($y = 95,883e^{-0,002x}$ com $R^2 = 0,9779$) e HaCat ($y = -0,1858x + 118,7$ com $R^2 = 0,9207$).

Tabela 18 - Tabela com os valores de IC50 (µl/ml) para cada uma das linhas celulares (3T3 e HaCat) na presença dos hidrolatos, H-AV e H-EC.

	IC50 (µl/ml)	
	3T3	HaCat
H-AV	205	359
H-EC	325,55	369,75

A atividade citotóxica de um extrato é tanto maior quanto menor for a concentração necessária para inibir 50 % da viabilidade celular da linha celular em estudo (IC50). Desta forma, o H-AV tem uma maior atividade citotóxica, já que os valores de IC50 (3T3: IC50 = 205 µl/ml; HaCat: IC50 = 359 µl/ml), para cada uma das linhas celulares, são mais baixos do que os obtidos para o H-EC (3T3: IC50 = 325,55 µl/ml; HaCat: IC50 = 369,75 µl/ml); e a linha celular 3T3 mostra-se mais sensível à ação de ambos os hidrolatos, já que os valores de IC50 (H-AV: IC50 = 205 µl/ml; H-EC: IC50 = 325,55 µl/ml) são mais baixos do que os obtidos para a linha celular HaCat (H-AV: IC50 = 359 µl/ml; H-EC: IC50 = 369,75 µl/ml) (tabela 18).

Através da observação dos perfis de citotoxicidade dos hidrolatos (gráficos 6 e 7), é possível verificar que ambos exercem um efeito citotóxico dependente da dose para a linha celular 3T3, sendo maior a ação do H-AV; e, para a linha celular HaCat, exercem um efeito citotóxico, dependente da dose, até uma determinada concentração de hidrolato, a partir da qual o seu efeito passa a ser estimulador da sua viabilidade celular. Este efeito estimulador ocorre para as concentrações mais baixas de hidrolato, sendo mais notório sob estimulação do H-EC.

Já que a atividade de um extrato depende da sua composição química, este estudo sugere que ambos os hidrolatos sejam constituídos por compostos que exercem efeito citotóxico sobre a viabilidade celular da linha celular 3T3 e que sobre a viabilidade celular da linha celular HaCat exerçam efeito estimulador ou citotóxico, dependendo da concentração em que se encontrem. Desta forma, o efeito maioritariamente citotóxico do H-AV ou o efeito maioritariamente estimulador do H-EC, sobre a linha celular HaCat, poderão ser justificados com a presença de uma maior concentração de compostos responsáveis por causar tais efeitos sobre esta linha, face ao volume total de compostos que constituem os hidrolatos.

Até ao presente estudo, não foram encontradas investigações que correlacionassem o comportamento da viabilidade celular da linha celular HaCat na presença de extratos de *C. ladanifer*. Contudo, estudos realizados por Koba K. *et al.* (2008 e 2009), segundo a metodologia adotada no presente estudo, procuraram analisar a atividade citotóxica de dois óleos essenciais do Togo e dos seus respetivos compostos maioritários, sobre a linha celular HaCat, com o objetivo de relacionar a atividade citotóxica dos óleos essenciais com a atividade citotóxica dos seus constituintes (90,91). Ambos permitiram concluir que:

- Existem compostos que têm atividade citotóxica sobre a linha celular HaCat, como o neral, o geranial e o citronellal, e existem outros que sobre ela exercem um efeito estimulador da viabilidade celular;
- Dos compostos capazes de estimular a viabilidade celular desta linha, há os que o fazem de forma dependente da dose, como o geraniol, e os que o fazem de forma dependente da diminuição da dose, como o ascaridole e o p-cymene;
- A atividade citotóxica dos óleos essenciais, sobre a linha celular HaCat, depende da ação combinada das atividades citotóxicas dos seus constituintes maioritários.

Desta forma, e embora os extratos analisados e os seus constituintes maioritários não correspondam aos mesmos que os do presente estudo, estas investigações permitem concluir que a linha celular HaCat pode sofrer aumentos ou diminuições de viabilidade celular dependentes das concentrações a que se encontrem determinadas substâncias naturais, face ao volume total de compostos do extrato. Tal perfil assemelha-se ao reportado no nosso estudo, com os hidrolatos, H-AV e H-EC, a exercerem efeitos diferentes, estimuladores ou citotóxicos, sobre esta linha celular e a serem constituídos pelas mesmas substâncias químicas em concentrações diferentes.

5.3.2. Ensaio MTT: OE-EC

No presente estudo, não foi possível analisar a atividade citotóxica do óleo essencial de *C. ladanifer*, OE-EC, pois os resultados obtidos pelo método do MTT representaram falsos positivos. A figura 25, imagens A.1 a D.1, demonstram os resultados obtidos.

Por visualização direta da placa de 96 poços e após a realização do ensaio MTT, foi verificado que, para as concentrações mais altas de hidrolato em estudo, o meio presente nos poços continha cristais de formazano a boiar à superfície, o que parecia sugerir que as células tinham, efetivamente, convertido este composto mas que, por algum motivo, se tinham perdido a aderência ao fundo do poço (figura 25, A.1 e A.2). Este meio foi descartado, com os cristais de formazano a ficarem aderidos à parede do poço (figura 25, B.1), e foi substituído por DMSO, com o objetivo de dissolver estes cristais. Como resultado desta dissolução, o meio de cada poço apresentou uma tonalidade roxa bastante mais intensa que a presente nos poços do controlo (células sem estimulação de hidrolato) (figura 25, C.1 e C.2).

Desta forma, procurou perceber-se se os cristais de formazano formados teriam efetivamente origem de uma conversão celular do composto MTT ou se existia um outro fenómeno responsável por tal conversão.

Estudos realizados por Bruggisser R. *et al.* (2001) analisaram a interferência de extratos de plantas com o ensaio de MTT, e adaptaram a metodologia adotada para a análise de compostos naturais. Estes investigadores comprovaram que, efetivamente, existem compostos de origem natural com um potencial intrínseco redutor do MTT, independente de qualquer tipo de mecanismo celular, representando, desta forma, falsos positivos neste ensaio. Neste sentido, e como alternativa à metodologia adotada, sugerem a introdução de passos de lavagem às células antes da realização do ensaio de MTT (84).

Estas lavagens, realizadas após 72 h de estimulação das células com o composto natural, consistem em retirar o meio presente no poço e substituí-lo por meio de cultura. Desta forma, é assegurado o tempo de reação das células com o composto natural e que, após a lavagem,

este não estará mais disponível no poço para reagir com o MTT, sendo que qualquer redução que lhe ocorra terá sido, unicamente, da responsabilidade das células. Neste sentido, analisaram, ainda, se dois passos de lavagem teriam um efeito diferente do que apenas a realização de um (84).

Os resultados mostraram-se bastante promissores, já que na presença de diferentes concentrações do composto natural e sem qualquer tipo de lavagem, o MTT apresentou uma redução, em cristais de formazano, dependente da dose, e, com a introdução de uma lavagem sobre as células esta redução diminuiu consideravelmente. Uma segunda lavagem sobre as células não demonstrou uma diminuição adicional da redução do MTT e aumentou, ainda, o risco de perda celular, para linhas celulares com menor capacidade de aderência (84).

Contudo, a aplicação desta metodologia, que torna possível a utilização do ensaio de MTT sem falsos positivos, como medidor da viabilidade celular e da atividade citotóxica de extratos naturais, requer diversas precauções: a sua aplicação estará diretamente depende da capacidade de aderência das células ao poço; antes da realização do ensaio, deverá ser realizado um controlo, sem a adição de células, onde será examinado o potencial redutor da amostra sobre o MTT; antes e durante o ensaio, o número de células deverá ser quantificado (84).

Para averiguar a ocorrência deste fenómeno no OE-EC, este foi colocado a incubar, na concentração mais alta testada (10 µl/ml), com o composto MTT, durante 4 h, sem interferência da luz solar. Deste ensaio, resultou a conversão do MTT em cristais de formazano, demonstrando que este extrato natural apresenta na sua constituição compostos com capacidade de reduzir o MTT por mecanismos não celulares (figura 25, D.1), o que invalida a aplicabilidade deste método, nesta dissertação, para a análise pretendida.

Apesar de ambos os extratos, hidrolatos e óleo essencial, terem origem natural, foi possível realizar o ensaio de MTT para a análise da atividade citotóxica dos hidrolatos, comprovando, desta forma, que os compostos que o constituem não têm a capacidade de reduzir diretamente o MTT em cristais de formazano, contrariamente aos compostos do OE-EC, nomeadamente o alfa-pineno, o canfeno e o acetato de borneol.

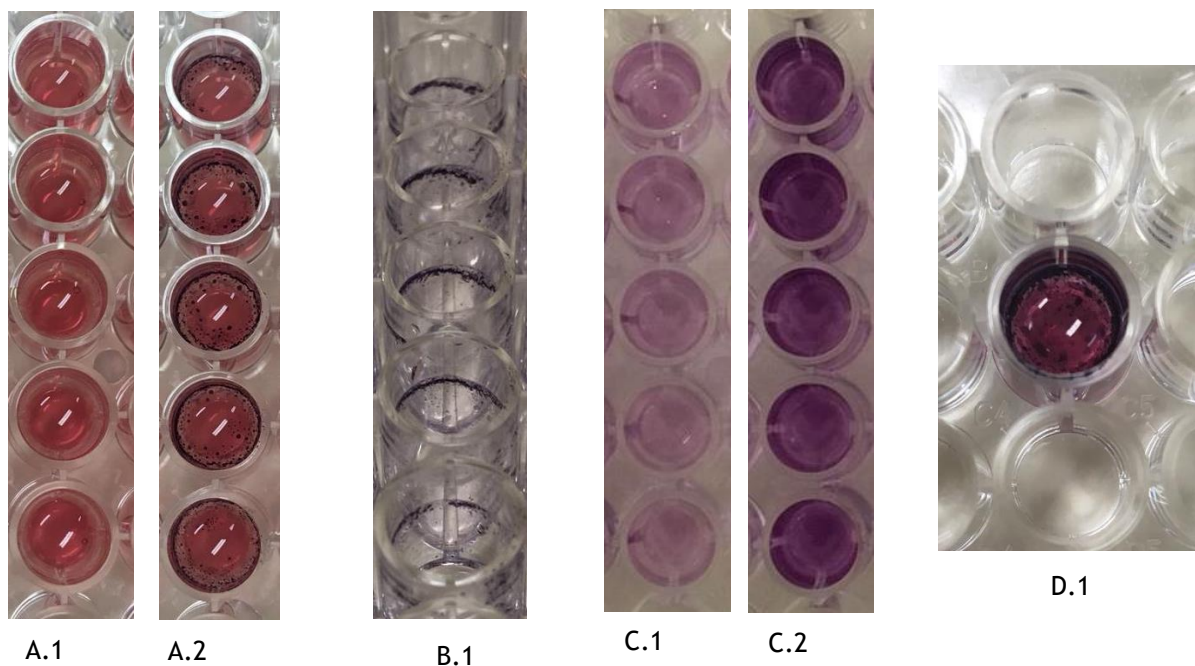


Figura 25 - Fotografia de partes do ensaio de MTT realizado do OE-EC. Após 24 h de incubação das células com meio de cultura (controlo) e com meio com as respetivas concentrações de óleo essencial, foram adicionados 20 μ l de MTT a cada poço e a placa foi colocada, novamente, a incubar durante 4 h, enrolada em papel de alumínio. A - Após este período, os resultados foram visualizados (A.1 - controlo: meio e células; A.2 - ensaio: meio com 10 μ l/ml de OE-EC e células). B - O meio presente nos poços, após este período de incubação com o MTT, foi retirado (B.1 - aspeto dos poços que continham o meio com 10 μ l/ml de OE-EC e células). C - A cada poço foram adicionados 200 μ l DMSO para dissolver os cristais de formazano (C.1 - controlo negativo: DMSO e cristais de formazano dissolvidos dos poços que anteriormente continham apenas meio de cultura e células; C.2 - ensaio: DMSO e cristais de formazano dissolvidos dos poços que anteriormente continham meio com 10 μ l/ml de OE-EC e células). D - ensaio que serviu de controlo do MTT para averiguar se este reagiria com o óleo essencial, que foi colocado na concentração mais alta a ser testada nos ensaios (D.1: controlo positivo do MTT, meio de cultura apenas com 10 μ l/ml de OE-EC).

5.4. Conclusões e Perspetivas Futuras

O ensaio MTT é largamente utilizado na quantificação da viabilidade celular, já que a sua conversão, em cristais de formazano, ocorre através de um mecanismo celular. Contudo, quando se trata de compostos naturais, este não é o método mais eficaz já que alguns destes são capazes de reduzir através de um mecanismo não celular, representando falsos positivos na metodologia adotada.

A atividade citotóxica do OE-EC de *C. ladanifer*, não é possível de determinar pois os seus constituintes conseguem reduzir o MTT, através de um mecanismo não celular.

Os hidrolatos de *C. ladanifer*, H-AV e H-EC, têm atividade citotóxica sobre as linhas celulares 3T3 e HaCat, comprovando que os seus constituintes não têm capacidade de converter o MTT, por mecanismos não celulares.

O H-AV tem maior atividade citotóxica para ambas as linhas celulares, do que o H-EC. A linha celular 3T3 é mais sensível à atividade citotóxica de ambos os hidrolatos, sendo que este efeito é dependente da dose.

Para a linha celular HaCat, ambos os hidrolatos têm efeito citotóxico ou estimulador da viabilidade celular, dependendo da concentração de hidrolato em estudo. O efeito estimulador da viabilidade celular desta linha ocorre para concentrações menores de hidrolato e é maior sobre a ação do H-EC, sugerindo que este apresenta em maior concentração de compostos responsáveis por tal efeito, relativamente ao H-AV.

Futuramente, para análises de óleos essenciais, poderá ser interessante:

- Estudar, isoladamente, a interferência dos seus compostos maioritários neste processo de conversão do MTT;
- Adaptar a metodologia no sentido da diminuição da interferência dos compostos naturais na conversão do MTT ou adotar um novo método de avaliação da atividade citotóxica, cuja característica natural dos extratos não represente uma limitação.

E, para análises de hidrolatos, poderá ser interessante:

- Analisar, individualmente e para ambas as linhas celulares, a contribuição dos seus compostos maioritários para o efeito citotóxico ou estimulador do respetivo hidrolato.

CAPÍTULO 6

DISCUSSÃO GERAL

Os conservantes são adicionados aos produtos cosméticos com o objetivo de evitar a sua contaminação por microrganismos, durante todo o seu tempo de vida útil, mantendo a qualidade do mesmo e diminuindo o risco de potenciais infecções para o utilizador. Contudo, as substâncias habitualmente utilizadas como conservantes em produtos cosméticos, têm estado associadas a certos tipos de doenças, nomeadamente o cancro da mama. Desta forma, urge a necessidade de encontrar substitutos conservantes que sejam eficazes e seguros (3,9-11).

Este estudo procura analisar quatro extratos de *C. ladanifer*, dois óleos essenciais (OE-AV e OE-EC) e dois hidrolatos (H-AV e H-EC), e estudá-los quanto às suas atividades antimicrobiana, antioxidante e citotóxica, com o objetivo de serem utilizados como ingredientes conservantes em formulações cosméticas, e como ingredientes ativos, em formulações cosméticos anti-envelhecimento.

A atividade biológica de um extrato depende da atividade química dos seus constituintes maioritários. Desta forma, foram realizados estudos fitoquímicos aos hidrolatos e feita a sua caracterização química, através da técnica de GC/MS. Para os óleos essenciais, a caracterização química foi realizada pela técnica de GC/MS, pelas empresas produtoras, que gentilmente os forneceram para o desenvolvimento deste estudo.

Os hidrolatos, H-AV e H-EC, são constituídos maioritariamente por um composto fenólico, o 4-Hidroxi-3-metoxibenzaldeído. Contudo, apresentam um conjunto de compostos pertencentes à família dos terpenos (borneol, p-Cimen-8-ol, (-)-Mirtenol e D-Verbenona) que, quando analisados de forma conjunta, resultam numa concentração, face ao volume total de compostos, superior à do composto maioritário.

Os óleos essenciais, OE-AV e OE-EC, são constituídos maioritariamente por compostos pertencentes à família dos terpenos, o alfa-pineno, o canfeno e o acetato de borneol, sendo que o OE-AV os apresenta em maior concentração, face ao volume total de compostos do óleo.

As três atividades biológicas em estudo foram analisadas para ambos os hidrolatos e para um dos óleos essenciais, o OE-EC. Para o OE-AV, a análise às atividades antioxidante e citotóxica não foi possível de ser realizada, já que a amostra deste óleo não foi suficiente para cumprir todos os objetivos necessários e a empresa produtora não dispunha de uma amostra adicional.

Para os hidrolatos, apenas o *S. agalactiae* e a *C. albicans*, obtiveram reduções visíveis do seu crescimento, para a concentração de 500 µl/ml de hidrolato (CMI = 500 µl/ml). Contudo, esta dose não se mostrou letal para nenhum destes microrganismos. Ainda assim, para ambos os hidrolatos, foram detetadas reduções significativas de crescimento microbiano principalmente para as concentrações mais altas de hidrolato testadas. A concentração de 500 µl/ml foi a única, para ambos, capaz de reduzir significativamente o crescimento de todos os microrganismos, sendo que na presença do H-AV essa redução foi de pelo menos 15 % (*S. aureus*) e na presença do H-EC de pelo menos 10 % (*S. aureus*). O H-AV tem, desta forma, uma maior atividade antimicrobiana.

Para os óleos essenciais, a redução visível do crescimento microbiano foi verificada para todos os microrganismos testados. Os valores de CMI do OE-AV variaram entre 2 µl/ml e 32 µl/ml, para o *S. epidermidis* e para o *E. hirae*, respectivamente, exercendo sobre ambos um efeito bacteriostático. O *A. brasiliensis* foi o único microrganismo para o qual não foi possível determinar a concentração mínima letal deste óleo essencial. Os valores de CMI do OE-EC variaram entre 0,5 µl/ml e 128 µl/ml, para o *A. brasiliensis*, e para a *P. aeruginosa* e a *E. coli*, respectivamente, exercendo sobre eles um efeito fungistático. O *S. agalactiae* e o *A. brasiliensis* foram os únicos microrganismos para os quais não foi possível determinar a concentração mínima letal deste óleo essencial.

Para efeitos comparativos, a atividade antimicrobiana é estudada como o resultado global da atividade de cada tipo de extrato. Assim, os óleos essenciais têm uma atividade antimicrobiana maior do que os hidrolatos e essa atividade está dependente da sua composição química maioritária em compostos pertencentes à família dos terpenos, como o alfa-pineno, o canfeno e o acetato de borneol. Desta forma, os óleos essenciais apresentam-se como potenciais ingredientes conservantes em produtos cosméticos.

Existe uma relação direta entre o efeito antimicrobiano de um conservante e a sua capacidade de induzir toxicidade (3). Desta forma, a análise à atividade citotóxica permitiu estabelecer os limites de concentração para os quais os extratos são eficazes como agentes antimicrobianos, sem representarem toxicidade celular.

Os valores de concentração para as quais o H-AV tem a capacidade de inibir 50 % da viabilidade celular de ambas as linhas foram: IC50 = 205 µl/ml (linha celular 3T3) e IC50 = 359 µl/ml (linha celular HaCat). Estes valores, para o H-EC, foram: IC50 = 325,55 µl/ml (linha celular 3T3) e IC50 = 369,75 µl/ml (linha celular HaCat). Desta forma, o H-AV exerce uma maior atividade citotóxica, tal como expectável já que apresentava, também, uma maior atividade antimicrobiana.

Todas as concentrações acima dos valores de IC50 representam toxicidade para as respetivas linhas celulares. Desta forma, para uma aplicação que não represente toxicidade celular, as concentrações para as quais estes extratos têm atividade antimicrobiana têm de ser inferiores aos valores de IC50, nomeadamente para a linha celular 3T3 que, de ambas, foi a mais suscetível à ação citotóxica dos hidrolatos.

A análise à atividade citotóxica do óleo essencial teria especial interesse neste estudo, já que a sua maior atividade antimicrobiana, relativamente à dos hidrolatos, lhes confere uma maior potencialidade de serem utilizados como ingredientes conservantes em produtos cosméticos. Contudo, não foi possível determinar a atividade citotóxica do OE-EC pois os seus compostos conseguiram reduzir o MTT, através de um mecanismo não celular, representando falsos positivos da metodologia adotada. Os seus compostos maioritários, alfa-pineno, canfeno e acetato de borneol, surgem como os principais responsáveis por tal redução, já que não estão presentes na constituição dos hidrolatos.

Estudos já realizados a óleos essenciais demonstram que do leque de atividades biológicas que apresentam, inclui-se a atividade antioxidante (21,22). Ao envelhecimento da pele, está associada a incapacidade do organismo de captar substâncias reativas de oxigênio, sendo necessário, desta forma, um agente externo capaz de realizar tal efeito (17,18). Assim, a análise à atividade antioxidante destes extratos de *C. ladanifer*, tem sido considerada para aplicações em produtos cosméticos de anti-envelhecimento.

Os hidrolatos, H-AV e H-EC, pelo método do DPPH, não demonstraram atividade antioxidante nas condições em que o estudo foi realizado, desta forma não se mostram potencialmente interessantes para a utilização como substância de combate ao envelhecimento da pele. Contrariamente, o OE-EC demonstrou ter uma potente atividade antioxidante já que a sua composição química é diferente da dos hidrolatos.

A concentração para a qual o OE-EC tem capacidade de reduzir 50 % do DPPH inicial é 9,122 µl/ml (EC50 = 9,122 µl/ml). Desta forma, para uma aplicação simultânea como agente antioxidante e agente antimicrobiano, as concentrações para as quais este extrato tem atividade antimicrobiana têm de ser iguais ou superiores aos valores de EC50.

Os valores de concentrações mínimas para os quais o OE-EC apresenta atividade antimicrobiana variam entre CMI = 0,5 µl/ml, para um fungo, e CMI = 128 µl/ml, para uma bactéria. O valor de EC50 está incluído na gama de concentrações mínimas de OE-EC que representam atividade antimicrobiana, para todos os microrganismos estudados. Desta forma, a utilização destas concentrações confere ao OE-EC a possibilidade de ser utilizado como agente antimicrobiano e antioxidante.

Para aplicação como ingredientes conservantes os óleos essenciais surgem, então, como uma opção mais plausível, já que apresentaram uma maior atividade antimicrobiana. A sua potente atividade antioxidante valoriza-os enquanto ingredientes ativos para aplicação em produtos cosméticos de anti-envelhecimento. Contudo, a sua utilização em produtos cosméticos só é possível se este for seguro. Neste sentido, e como a sua atividade citotóxica não pôde ser avaliada, o estudo à sua segurança não foi conclusivo.

Os hidrolatos, ainda que tenham demonstrado uma menor atividade antimicrobiana, tiveram a capacidade de reduzir de forma significativa o crescimento dos microrganismos estudados, para concentrações que não representam índices de citotoxicidade. Desta forma, é mais plausível que a sua aplicabilidade como conservante em produtos cosméticos, passe por integrá-los num sistema conservante. A sua inexistente atividade antioxidante não lhes confere um valor acrescido na área do anti-envelhecimento.

CAPÍTULO 7

CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

A crescente valorização dos produtos cosméticos na sociedade atual, bem como a necessidade de uma preservação eficaz e segura dos mesmos, tem forçado a indústria cosmética a procurar alternativas aos ingredientes conservantes habitualmente utilizados nestes produtos. Neste contexto, o presente estudo procura avaliar a potencialidade conservante de dois tipos de extratos naturais da planta *Cistus ladanifer*, o hidrolato e o óleo essencial, bem como a sua segurança biológica e o seu acrescido valor na área do anti-envelhecimento, enquanto ingredientes ativos.

O óleo essencial surge como o extrato mais ativo já que apresenta maiores atividades antimicrobiana e antioxidante, apesar de não ter sido possível avaliar a sua segurança biológica pela determinação da citotoxicidade. Desta forma, parece ser aquele que mais facilmente poderá ser transferido para uma aplicação efetiva como ingrediente conservante em formulações cosméticas e como ingrediente ativo em formulações cosméticas de anti-envelhecimento.

Seria interessante dar continuidade a este estudo de forma a preencher os requisitos apresentados pelo SCCS para uma aplicação ativa e segura de substâncias naturais em formulações cosméticas, para que, posteriormente, possam ser propostas como ingredientes naturais e possam ser adicionadas, nomeadamente, à lista positiva do anexo V do Regulamento Europeu n.º 1223/2009 dos ingredientes conservantes autorizados para utilização em produtos cosméticos.

Das atividades biológicas possíveis de analisar, seria interessante incluir a atividade anti-viral e a atividade anti-inflamatória, especificamente para as células da pele, já que, quando demonstradas, conferem aos extratos uma maior gama de aplicações na área das indústrias farmacêutica e cosmética; e, no sentido de completar a determinação do perfil de segurança dos extratos, seria interessante determinar os seus potenciais efeitos mutagénicos e genotóxicos, determinar a sua fototoxicidade e realizar os testes de corrosão dérmica, irritação dérmica e sensibilização cutânea.

CAPÍTULO 8

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mitsui T. *New Cosmetic Science*. Elsevier. 1998. 3-15 p.
2. Ali S, Halim F, Ahmad NB. Beauty Premium and Halal Cosmetics Industry. *J Mark Manag Consum Behav*. 2016;1(4):52–63.
3. Halla N, Fernandes IP, Heleno SA, Costa P, Boucherit-Otmani Z, Boucherit K, et al. Cosmetics preservation: A review on present strategies. *Molecules*. 2018;23(7):1–41.
4. Europeu P. EMAS, Regulamento nº1221/2009 de 25 de Novembro do Parlamento Europeu e do Conselho [Internet]. 2009. p. 1–45. Available from: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:342:0001:0045:PT:PDF>
5. European Commission [Internet]. 2018. Available from: https://ec.europa.eu/commission/index_pt
6. European Commission. SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety), SCCS Notes of Guidance for the Testing of Cosmetic Ingredients and their Safety Evaluation 9th revision. *Scs*. 2016;1564(April):151.
7. Infarmed [Internet]. 2018. Available from: <http://www.infarmed.pt/>
8. U.S. Food and Drug Administration [Internet]. 2018. Available from: <https://www.fda.gov/>
9. Varvaresou A, Papageorgiou S, Tsirivas E, Protopapa E, Kintziou H, Kefala V, et al. Self-preserving cosmetics. *Int J Cosmet Sci*. 2009;31(3):163–75.
10. Carvalho IT, Estevinho BN, Santos L. Application of microencapsulated essential oils in cosmetic and personal healthcare products - A review. *Int J Cosmet Sci*. 2016;38(2):109–19.
11. Cristina Lemini, Ruth Jaimez, Maria Estela Ávila, Yanira Franco FL and AEL. In vivo and in vitro estrogen bioactivities of alkyl parabens. *Toxicol Ind Health*. 2003;19:69–79.
12. Comission E. The SCCS notes os guidance for the testing of cosmetic ingredients and their safety evaluation 9th revision. 2016;(April).
13. Pharmacopoeia E. 5.1.3. Efficacy of antimicrobial preservation. *European Pharmacopoeia v7.0*. 2005. 447-449 p.
14. United T, Pharmacopeial S, All C. *Microbiological Tests*. Vol. 2209. 2013. 13-14 p.
15. Siegert W. ISO 11930 - A Comparison to other Methods to Evaluate the Efficacy of Antimicrobial Preservation. *Sofw J*. 2012;138(7):44–53.
16. Kitchin DMP and JS. Oxidative damage, skin aging, antioxidants and a novel antioxidant rating system. *J drugs dermatology*. 2010;9(1):11–5.
17. Edris AE. *Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile*

- Constituents: A Review. Wiley Intersci. 2007;21:308–23.
18. Miguel MG. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: A short review. *Molecules*. 2010;15(12):9252–87.
 19. Masaki H. Role of antioxidants in the skin: Anti-aging effects. *J Dermatol Sci*. 2010;58(2):85–90.
 20. Nobre C, Gonçalves M, Mendes B, Santos E, Pacheco J, Duarte I, et al. Extraction of essential oils from forestry wastes : a contribution to the sustainability of forest management ? Lignocellul Crop as Feed Futur Biorefineries, Lisbon 26-31 July 2014. 2014;(July).
 21. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils - A review. *Food Chem Toxicol*. 2008;46(2):446–75.
 22. Aburjai T, Natsheh FM. Plants Used in Cosmetics. *Phyther Res*. 2003;17(9):987–1000.
 23. Dreger M, Wielgus K. Application of essential oils as natural cosmetic preservatives. *Herba Pol*. 2013;59(4).
 24. ISO/DIS 16128-1 -Guidelines on Technical Definitions and Criteria for Natural & Organic Cosmetic Ingredients and Products - Part 1: Definitions for Ingredients. 2014;
 25. NCCLS. Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico. Vol. 23, Norma Aprovada. 2005. M7-A6 p.
 26. NCCLS. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica dos Fungos Filamentosos: Norma Aprovada. Vol. 22, NCCLS document M38-A. 2002. 1-50 p.
 27. NCCLS. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica : Norma Aprovada – Segunda Edição. Vol. 22, NCCLS Documento M27-A2. 2012.
 28. Maria Vieira, Lucinda J. Bessa, M. Rosário Martins, Sílvia Arantes, António P. S. Teixeira, Ângelo Mendes, Paulo Martins Costa ADFB. Chemical Composition, Antibacterial, Antibiofilm and Synergistic Properties of Essential Oils from *Eucalyptus globulus* Labill. and Seven Mediterranean Aromatic Plants. *ARPN Journal of Engineering and Applied Sciences*. 2017;12(10):3218–21.
 29. Hyldgaard M, Mygind T, Meyer RL. Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Front Microbiol*. 2012;3(JAN).
 30. Palmeira-de-Oliveira A, Salgueiro L, Palmeira-de-Oliveira R, Martinez-de-Oliveira J, Pina-Vaz C, Queiroz J, et al. Anti-Candida Activity of Essential Oils. *Mini-Reviews Med Chem*. 2009;9(11):1292–305.
 31. Lamprecht P, Schmitt WH, Gross WL. Essential Oils of Aromatic Plants with Antibacterial,

- Antifungal, Antiviral, and Cytotoxic Properties – an Overview. *Nephrol Dial Transplant*. 1998;13(1):213–21.
32. Vigan M. Essential oils: Renewal of interest and toxicity. *Eur J Dermatology*. 2010;20(6):685–92.
 33. Oliveira AP, Silva LR, Ferreres F, De Pinho PG, Valentão P, Silva BM, et al. Chemical assessment and in vitro antioxidant capacity of *Ficus carica* latex. *J Agric Food Chem*. 2010;58(6):3393–8.
 34. Guimarães R, Sousa MJ, Ferreira ICFR. Contribution of Essential Oils and Phenolics to the Antioxidant Properties of Aromatic Plants. :1–21.
 35. Kedare SB, Singh RP. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol*. 2011;48(4):412–22.
 36. Molyneux P. The Use of the Stable Free Radical Diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Songklanakarin J Sci Technol*. 2004;26(December 2003):211–9.
 37. Śmigielski KB, Prusinowska R, Krosowiak K, Sikora M. Comparison of qualitative and quantitative chemical composition of hydrolate and essential oils of lavender (*Lavandula angustifolia*). *J Essent Oil Res*. 2013;25(4):291–9.
 38. Gawde AJ, Cantrell CL, Zheljzkov VD. Dual extraction of essential oil and podophyllotoxin from *Juniperus virginiana*. *Ind Crops Prod*. 2009;30(2):276–80.
 39. Guzmán B, Vargas P. Historical biogeography and character evolution of Cistaceae (Malvales) based on analysis of plastid *rbcl* and *trnL-trnF* sequences. *Org Divers Evol*. 2009;9(2):83–99.
 40. Guzmán B, Vargas P. Long-distance colonization of the Western Mediterranean by *Cistus ladanifer* (Cistaceae) despite the absence of special dispersal mechanisms. *J Biogeogr*. 2009;36(5):954–68.
 41. Frazão DF, Raimundo JR, Domingues JL, Quintela-Sabarís C, Gonçalves JC, Delgado F. *Cistus ladanifer* (Cistaceae): a natural resource in Mediterranean-type ecosystems. *Planta*. 2018;247(2):289–300.
 42. Guzmán B, Vargas P. Systematics, character evolution, and biogeography of *Cistus* L. (Cistaceae) based on ITS, *trnL-trnF*, and *matK* sequences. *Mol Phylogenet Evol*. 2005;37(3):644–60.
 43. Papaefthimiou D, Papanikolaou A, Falara V, Givanoudi S, Kostas S, Kanellis AK. Genus *Cistus*: a model for exploring labdane-type diterpenes' biosynthesis and a natural source of high value products with biological, aromatic, and pharmacological properties. *Front Chem*. 2014;2(June):1–19.
 44. Gülz PG, Herrmann T, Hangst K. Leaf trichomes in the genus *Cistus*. *Flora*. 1996;191(1):85–104.
 45. Talavera S, Gibbs PE, Herrera J. Reproductive biology of *Cistus ladanifer* (Cistaceae). *Plant Syst Evol*. 1993;186(3–4):123–34.

46. Guzmán B, Narbona E, Vargas P. Similar reproductive success of the two petal colour polymorphisms of *cistus ladanifer* (Cistaceae). *Plant Biosyst.* 2011;145(4):931–7.
47. Gomes PB, Mata VG, Rodrigues AE. Characterization of the portuguese-grown *cistus ladanifer* essential oil. *J Essent Oil Res.* 2005;17(2):160–5.
48. Weyerstahl P, Marschall H, Weirauch M, Thefeld K, Surburg H. Constituents of commercial Labdanum oil. *Flavour Fragr J.* 1998;13(5):295–318.
49. Alías JC, Sosa T, Valares C, Escudero JC, Chaves N. Seasonal Variation of *Cistus ladanifer* L. Diterpenes. *Plants.* 2012;1(1):6–15.
50. Greche H, Mrabet N, Zrira S, Ismaïli-Alaoui M, Benjilali B, Boukir A. The Volatiles of the leaf oil of *cistus ladanifer* l. Var. *Albiflorus* and labdanum extracts of moroccan origin and their antimicrobial Activities. *J Essent Oil Res.* 2009;21(2):166–73.
51. Valares Masa C, Sosa Díaz T, Alías Gallego JC, Chaves Lobón N. Quantitative Variation of Flavonoids and Diterpenes in Leaves and Stems of *Cistus ladanifer* L. at Different Ages. *Molecules.* 2016;21(3):275.
52. Mariotti JP, Tomi F, Casanova J, Costa J, Bernardini AF. Composition of the essential oil of *Cistus ladaniferus* L. cultivated in Corsica (France). *Flavour Fragr J.* 1997;12(February 2015):147–51.
53. Verdeguer M, Blázquez MA, Boira H. Chemical composition and herbicidal activity of the essential oil from a *Cistus ladanifer* L. population from Spain. *Nat Prod Res.* 2012;26(17):1602–9.
54. Robles C, Bousquet-Mélou A, Garzino S, Bonin G. Comparison of essential oil composition of two varieties of *Cistus ladanifer*. *Biochem Syst Ecol.* 2003;31(3):339–43.
55. Gulz P-G, Kobold U, Michaelis K, Vostrowsky O. The Composition of Terpene Hydrocarbons in the Essential Oils from Leaves of Four *Cistus* Species. *Zeitschrift fuer Naturforsch.* 1984;39(7–8):699–709.
56. H. Zidane, M. Elmiz, F. Aouinti, A. Tahani, J. Wathelet MS and AE. Chemical composition and antioxidant activity of essential oil, various organic extracts of *Cistus ladanifer* and *Cistus libanotis* growing in Eastern Morocco. *African J Biotechnol.* 2013;12(34):5314–20.
57. Rincón J, De Lucas A, Gracia I. Isolation of rock rose essential oil using supercritical CO₂ extraction. *Sep Sci Technol.* 2000;35(16):2745–63.
58. Barrajión-Catalán E, Fernández-Arroyo S, Saura D, Guillén E, Fernández-Gutiérrez A, Segura-Carretero A, et al. Cistaceae aqueous extracts containing ellagitannins show antioxidant and antimicrobial capacity, and cytotoxic activity against human cancer cells. *Food Chem Toxicol.* 2010;48(8–9):2273–82.

59. Amensour M, Sendra E, Pérez-Alvarez JA, Skali-Senhaji N, Abrini J, Fernández-López J. Antioxidant activity and chemical content of methanol and ethanol extracts from leaves of rockrose (*Cistus ladaniferus*). *Plant Foods Hum Nutr.* 2010;65(2):170–8.
60. Andrade D, Gil C, Breitenfeld L, Domingues F, Duarte AP. Bioactive extracts from *Cistus ladanifer* and *Arbutus unedo* L. *Ind Crops Prod.* 2009;30(1):165–7.
61. Ramalho PS, Freitas VAP De, Macedo A, Silva G, Silva AMS. Volatile components of *Cistus ladanifer* leaves. *Volatile components of Cistus ladanifer leaves.* 2016;1026(September 1999):23–6.
62. Teixeira S, Mendes A, Alves A, Santos L. Simultaneous distillation-extraction of high-value volatile compounds from *Cistus ladanifer* L. *Anal Chim Acta.* 2007;584(2):439–46.
63. Bordignon SAL, Moreno PRH, Zuanazzi JAS, Henriques AT, Apel MA. Essential oil constituents of *Cistus ladanifer* leaves. 2010;46(4):545–6.
64. Chaves N, Escudero JC, Gutiérrez-Merino C. Seasonal variation of exudate of *Cistus ladanifer*. *J Chem Ecol.* 1993;19(11):2577–91.
65. Vogt T, Proksch P, Gülz PG. Epicuticular Flavonoid Aglycones in the Genus *Cistus*, *Cistaceae*. *J Plant Physiol.* 1987;131(1–2):25–36.
66. Eckhard W, M K. Flavonoid Aglycones in the Leaf Resin of Some *Cistus* Species. 2018;303–6.
67. S. Fernández-Arroyo, E. Barrañón-Catalán, V. Micó AS-C and AF-G. High-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray time-of-flight and ion-trap tandem mass spectrometry to identify phenolic compounds from a *Cistus ladanifer* aqueous extract. *Phytochem Anal.* 2010;21(4):307–13.
68. Chaves N, Escudero JC, Gutierrez-Merino C. Role of ecological variables in the seasonal variation of flavonoid content of *Cistus ladanifer* exudate. *J Chem Ecol.* 1997;23(3):579–603.
69. Lillian Barros, Montserrat Duenas, Carlos Tiago Alves, Sónia Silva, Mariana Henriques, Celestino Santos-Buelga ICFRF. Antifungal activity and detailed chemical characterization of *Cistus ladanifer* phenolic extracts. :1–20.
70. Barrañón-Catalán E, Fernández-Arroyo S, Roldán C, Guillén E, Saura D, Segura-Carretero A, et al. A systematic study of the polyphenolic composition of aqueous extracts deriving from several *Cistus* genus species: Evolutionary relationship. *Phytochem Anal.* 2011;22(4):303–12.
71. Benayad N, Mennane Z, Charof R, Hakiki A, Mosaddak M. Antibacterial activity of essential oil and some extracts of *Cistus ladaniferus* from oulmes in Morocco. *J Mater Environ Sci.* 2013;4(6):1066–71.
72. Ferreira S, Santos J, Duarte A, Duarte AP, Queiroz JA, Domingues FC. Screening of antimicrobial


- activity of *Cistus ladanifer* and *Arbutus unedo* extracts. *Nat Prod Res.* 2012;26(16):1558–60.
73. Tomás-Menor L, Morales-Soto A, Barraji3n-Catal3n E, Rold3n-Segura C, Segura-Carretero A, Micol V. Correlation between the antibacterial activity and the composition of extracts derived from various Spanish *Cistus* species. *Food Chem Toxicol.* 2013;55:313–22.
 74. Karim H, Boubaker H, Askarne L, Talibi I, Msanda F, Boudyach EH, et al. Antifungal properties of organic extracts of eight *Cistus* L. species against postharvest citrus sour rot. *Lett Appl Microbiol.* 2016;62(1):16–22.
 75. S3nchez-Vioque R, Polissiou M, Astraka K, Mozos-Pascual M de los, Tarantilis P, Herraiz-Pe3alver D, et al. Polyphenol composition and antioxidant and metal chelating activities of the solid residues from the essential oil industry. *Ind Crops Prod.* 2013;49:150–9.
 76. Kulkarni AP, Mahal HS, Kapoor S, Aradhya SM. In Vitro Studies on the Binding, Antioxidant, and Cytotoxic Actions of Punicalagin. *J Agric Food Chem [Internet].* 2007;55(4):1491–500. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf0626720>
 77. Inoue M, Suzuki R, Sakaguchi N, Li Z, Takeda T, Ogihara Y, et al. Selective induction of cell death in cancer cells by gallic acid. *Biol Pharm Bull.* 1995;18(11):1526–30.
 78. Gomes PB, Mata VG, Rodrigues AE, Gomes PB, Mata VG, Characterization AER, et al. Characterization of the Portuguese-Grown *Cistus ladanifer* Essential Oil Characterization of the Portuguese-Grown *Cistus ladanifer* Essential Oil. 2017;2905(February).
 79. Journal F, Universit FT, Paoli CP. Composition of the Essential Oil of *Cistus ladaniferus* L. Cultivated in Corsica (France). 1997;1026(February 2015).
 80. S. Santos E, Balseiro-Romero M, Abreu MM, Mac3as F. Bioextracts of *Cistus ladanifer* L. growing in S3o Domingos mine as source of valuable compounds. *J Geochemical Explor.* 2017;174:84–90.
 81. Vaghasiya Y, Dave R, Chanda S. Phytochemical Analysis of Some Medicinal Plants from Western Region of India. *Res J Med Plant.* 2011;5(5):567–76.
 82. Gi3o MS, Gonz3lez-Sanjos3 ML, Rivero-P3rez MD, Pereira CI, Pintado ME, Malcata FX. Infusions of Portuguese medicinal plants: Dependence of final antioxidant capacity and phenol content on extraction features. *J Sci Food Agric.* 2007;87(14):2638–47.
 83. Mann CM, Markham JL. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. 1998;(1994):538–44.
 84. Bruggisser R, Von Daeniken K, Jundt G, Schaffner W, Tullberg-Reinert H. Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. *Planta Med.* 2002;68(5):445–8.

85. Oliveira AS, Martinez-de-Oliveira J, Donders GGG, Palmeira-de-Oliveira R, Palmeira-de-Oliveira A. Anti-Candida activity of antidepressants sertraline and fluoxetine: effect upon pre-formed biofilms. *Med Microbiol Immunol*. 2018;207(3–4):195–200.
86. Scherer R, Godoy HT. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chem*. 2009;112(3):654–8.
87. Sharma OP, Bhat TK. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chem*. 2009;113(4):1202–5.
88. Scudiero D a, Shoemaker RH, Paull KD, Scudiere D a, Paul KD, Monks A, et al. Evaluation of a Soluble Tetrazolium / Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines Evaluation of a Soluble Tetrazolium / Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human an. 1988;4827–33.
89. ISO 10993-5: Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. 2009;
90. Koffi K, Komla S, Catherine G, Christine R, Jean-Pierre C, Laurence N. In vitro cytotoxic activity of *Cymbopogon citratus* L. and *Cymbopogon nardus* L. essential oils from Togo. *Bangladesh J Pharmacol*. 2009;4(1):29–34.
91. Koba K, Catherine G, Raynaud C, Chaumont J. Chemical Composition and Cytotoxic Activity of *Chenopodium ambrosioides* L. Essential Oil from Togo. *Bangladesh J Sci Ind Res*. 2009;44(4):435–40.

ANEXOS


Anexo 1 - Documento para reavaliação de um ingrediente cosmético ou para a entrada de um novo no mercado, publicado pelo SCCS.

APPENDIX 3: STANDARD FORMAT OF THE OPINIONS



Scientific Committee on Consumer Safety
SCCS

OPINION ON
.....



The SCCS adopted this document
at its plenary meeting/by written procedure on xx

122

ACKNOWLEDGMENTS

Members of the Working Group are acknowledged for their valuable contribution to this Opinion. The members of the Working Group are:

The SCCS members:
.....
.....
.....
.....

The SCHEER members (if applicable):
.....
.....

External experts (if applicable):
.....
.....
.....

The additional contribution of the following experts is gratefully acknowledged (if applicable):
XXXXXX

All Declarations of Working Group members are available on the following webpage:
http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/experts/declarations/sccs_en.htm

If relevant: This Opinion has been subject to a commenting period of XXX weeks (from to) after its initial publication.

There were comments received and the final version of the Opinion includes information on XXXX (section concerned)....compared to the preliminary one.
There were changes/no change in the conclusions.

OR - There were no comments received and the final version of the opinion remained unchanged compared to the preliminary one.

123

1. ABSTRACT

The SCCS concludes the following:

Q1
Response
Q2
Response
Q3
Response
etc

Keywords: SCCS, scientific opinion, INCI name, type of product, Regulation 1223/2009, CAS, EC

Opinion to be cited as: SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety), Opinion on INCI name - Submission, preliminary version of (date), final version of (date), SCCS/...../XX.....

About the Scientific Committees

Two independent non-food Scientific Committees provide the Commission with the scientific advice it needs when preparing policy and proposals relating to consumer safety, public health and the environment. The Committees also draw the Commission's attention to the new or emerging problems which may pose an actual or potential threat.

These Committees are: the Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS) and the Scientific Committee on Health, Environmental and Emerging Risks (SCHEER) and they are made up of scientists appointed in their personal capacity.

In addition, the Commission relies upon the work of the European Food Safety Authority (EFSA), the European Medicines Agency (EMA), the European Centre for Disease prevention and Control (ECDC) and the European Chemicals Agency (ECHA).

SCCS

The Committee shall provide Opinions on questions concerning all types of health and safety risks (notably chemical, biological, mechanical and other physical risks) of non-food consumer products (for example: cosmetic products and their ingredients, toys, textiles, clothing, personal care and household products such as detergents, etc.) and services (for example: tattooing, artificial sun tanning, etc.).

Scientific Committee members

Bernauer Ulrike, Bodin Laurent, Chaudhry Qasim, Coenraads Pieter-Jan, Dusinska Maria, Ezendam Janine, Gaffet Eric, Galli Corrado Lodovico, Granum Berit, Panteri Eirini, Rogiers Vera, Rousselle Christophe, Stepnik Maciej, Vanhaecke Tamara, Wijnhoven Susan

Contact

European Commission
Health and Food Safety
Directorate C: Public Health, Country Knowledge, Crisis Management
Unit C2 – Country Knowledge and Scientific Committees
L-2920 Luxembourg
SANTE-C2-SCCS@ec.europa.eu

© European Union, 20XX

ISSN

ISBN

Doi:

ND-

The Opinions of the Scientific Committees present the views of the independent scientists who are members of the committees. They do not necessarily reflect the views of the European Commission. The Opinions are published by the European Commission in their original language only.

http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/index_en.htm

TABLE OF CONTENTS

1. ABSTRACT	124
2. ABSTRACT MANDATE FROM THE EUROPEAN COMMISSION	127
3. OPINION	128
3.1 CHEMICAL AND PHYSICAL SPECIFICATIONS.....	128
3.1.1 Chemical identity	128
3.1.2 Physical form	128
3.1.3 Molecular weight	128
3.1.4 Purity, composition and substance codes	128
3.1.5 Impurities / accompanying contaminants	128
3.1.6 Solubility	128
3.1.7 Partition coefficient (Log P _{ow})	128
3.1.8 Additional physical and chemical specifications	128
3.1.9 Homogeneity and Stability	129
3.2 TOXICOKINETICS	129
3.2.1 Dermal / percutaneous absorption	129
3.2.2 Other studies on toxicokinetics	129
3.3 EXPOSURE ASSESSMENT.....	129
3.3.1 Function and uses	129
3.3.2 Calculation of SED/LED	129
3.4 TOXICOLOGICAL EVALUATION.....	129
3.4.1 Irritation and corrosivity	129
3.4.2 Skin sensitisation	129
3.4.3 Acute toxicity	129
3.4.4 Repeated dose toxicity	129
3.4.5 Reproductive toxicity.....	130
3.4.6 Mutagenicity / genotoxicity.....	130
3.4.7 Carcinogenicity	130
3.4.8 Photo-induced toxicity.....	130
3.4.9 Human data	130
3.4.10 Special investigations.....	130
3.5 SAFETY EVALUATION (INCLUDING CALCULATION OF THE MOS).....	130
3.6 DISCUSSION	130
4. CONCLUSION	131
5. MINORITY OPINION	131
6. REFERENCES.....	131
7. GLOSSARY OF TERMS.....	131
8. LIST OF ABBREVIATIONS	131

2. ABSTRACT MANDATE FROM THE EUROPEAN COMMISSION

Background

Terms of reference

Q1
Q2
Q3

Additional information

(If appropriate)

This chapter could provide additional background information relevant to the assessment (e.g. previous Opinions or other assessments issued by other bodies/organisations).

3. OPINION

3.1 CHEMICAL AND PHYSICAL SPECIFICATIONS

3.1.1 Chemical identity

3.1.1.1 Primary name and/or INCI name

3.1.1.2 Chemical names

3.1.1.3 Trade names and abbreviations

3.1.1.4 CAS / EC number

3.1.1.5 Structural formula

3.1.1.6 Empirical formula

3.1.2 Physical form

3.1.3 Molecular weight

3.1.4 Purity, composition and substance codes

3.1.5 Impurities / accompanying contaminants

3.1.6 Solubility

3.1.7 Partition coefficient (Log P_{ow})

3.1.8 Additional physical and chemical specifications

Where relevant:

- organoleptic properties (colour, odour, taste if relevant)
- melting point
- boiling point
- flash point
- vapour pressure
- density

128

- viscosity
- pKa
- pH
- refractive index
- UV/visible light absorption spectrum

3.1.9 Homogeneity and Stability

3.2 TOXICOKINETICS

3.2.1 Dermal / percutaneous absorption

3.2.2 Other studies on toxicokinetics

3.3 EXPOSURE ASSESSMENT

3.3.1 Function and uses

3.3.2 Calculation of SED/LED

3.4 TOXICOLOGICAL EVALUATION

3.4.1 Irritation and corrosivity

3.4.1.1 Skin irritation

3.4.1.2 Mucous membrane irritation / eye irritation

3.4.2 Skin sensitisation

3.4.3 Acute toxicity

3.4.3.1 Acute oral toxicity

3.4.3.2 Acute dermal toxicity

3.4.3.3 Acute inhalation toxicity

3.4.4 Repeated dose toxicity

3.4.4.1 Repeated dose (28 days) oral / dermal / inhalation toxicity

3.4.4.2 Sub-chronic (90 days) oral / dermal / inhalation toxicity

3.4.4.3 Chronic (> 12 months) toxicity

129

3.4.5 Reproductive toxicity

3.4.5.1 Fertility and reproduction toxicity

3.4.5.2 Developmental Toxicity

3.4.6 Mutagenicity / genotoxicity

3.4.6.1 Mutagenicity / genotoxicity *in vitro*

3.4.6.2 Mutagenicity / genotoxicity *in vivo*

3.4.7 Carcinogenicity

3.4.8 Photo-induced toxicity

3.4.8.1 Phototoxicity / photo-irritation and photosensitisation

3.4.8.2 Photomutagenicity / photoclastogenicity

3.4.9 Human data

3.4.10 Special investigations

3.5 SAFETY EVALUATION (INCLUDING CALCULATION OF THE MOS)

3.6 DISCUSSION

Physicochemical properties

Toxicokinetics

Exposure

Toxicological Evaluation

Irritation and corrosivity

Skin sensitisation

Acute toxicity

Repeated dose toxicity

Reproductive toxicity

Mutagenicity / genotoxicity

Carcinogenicity

Photo-induced toxicity

Human data

Special investigation

4. CONCLUSION

5. MINORITY OPINION

6. REFERENCES

7. GLOSSARY OF TERMS

A glossary of technical terms should be provided, or refer to an accessible glossary.

8. LIST OF ABBREVIATIONS

In alphabetical order

Anexo 2 - Identificação e quantificação dos compostos presentes nos óleos essenciais em estudo

Tabela 19 - Composição dos óleos essenciais de *C. ladanifer*. A % Área representa a quantidade relativa de cada composto, obtida através da relação entre a área relativa do composto e a área total dos picos identificados na amostra.

Nome do Composto	OE-AV (% Área)	OE-EC (% Área)
α -Pinene	38,30	29,09
Camphene	16,06	6,56
1,2,4,4-Tetramethylcyclopentene	1,80	-
Tricyclene	3,26	-
Limonene	1,60	-
B-Pinene	0,74	-
Terpinolen	0,37	-
o-Cymene	3,25	-
Limonene	1,60	1,16
2,2,6-Trimethylcyclohexanone	8,56	-
Acetophenone	0,22	-
α -Campholenal	0,92	-
L-pinocarveol	0,81	-
Alcanfor	0,78	-
Borneol	1,05	1,23
Pinanone	0,90	-
Acetato de borneol	5,37	5,40
Delta-3-careno	-	0,23
Alfa-terpineno	-	1,22
3,5-xilenol	-	0,35
Delta-felandrene	-	0,36

p-menta (1,4) 8-dieno	-	1,86
1,8-cineol (eucalyptol)	-	0,26
m-cimeno	-	2,81
Octanona-3	-	0,14
tetrahidrometilpirano	-	0,35
2,6-dimetilheptenal	-	2,66
Dimetil estireno	-	0,60
Delta-ionona	-	1,96
Cloreto de bornilo	-	0,62
Canfolenal	-	0,35
p-mente-1-ene-4-ol	-	1,22
Tujene-3-ol	-	1,59
Ledene	-	1,03
Acetato de p-mentene-1-ol	-	1,57
p-mente-1-ene-8-ol	-	1,73
Farnesol	-	0,65
Cadina-3,9-dieno	-	2,98
Farneseno	-	1,05
Copaeno	-	0,73
Cadina-1,3,5-trieno	-	0,42
Timol	-	1,43
Guaia-5,11-dieno	-	6,05
Indefinidos	16,01	3
<hr/>		
% Total de compostos identificados	Não referenciado	82,49
<hr/>		

Anexo 3 - Validação do método do DMSO como emulsionante na análise atividade antimicrobiana

Para testar qual a percentagem máxima de DMSO tolerada pelos microrganismos, estes foram colocados a crescer em meio de cultura líquido com diferentes percentagens de DMSO. Após determinação da percentagem máxima por eles tolerada foi verificando se esta seria suficiente para emulsionar o óleo essencial em meio de cultura líquido.

Microrganismos em estudo:

- *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538);
- *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 178970);
- *Enterococcus hirae* (ATCC 179954);
- *Streptococcus agalactiae* (ATCC 181324);
- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027);
- *Escherichia coli* (ATCC 8739);
- *Candida albicans* (ATCC 10231);
- *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404).

Percentagens de DMSO em teste:

- 2 % a 7 % com intervalos de 0,5 %

Metodologia:

As soluções contendo meio de cultura líquido, respetivo para o microrganismo, e DMSO, nas respetivas percentagens, foram preparadas em *eppendorfs*, e, posteriormente, foram pipetadas para uma placa estéril de 96 poços (50 µl, para as bactérias e para a levedura e 100 µl, para o fungo filamentosos). Os ensaios foram realizados em duplicado. Na placa incluíram-se, ainda, controlos positivos (meio de cultura líquido e inóculo) e controlos negativos (DMSO e inóculo).

A preparação do inóculo e posterior inoculação na placa foram feitos segundo a metodologia *standard* apresentada no ponto “Determinação da CMI”. Após os respetivos períodos de incubação o crescimento microbiano foi visualizado.

Resultados e Conclusões:

Para as percentagens de entre 3 e 4,5 %, os microrganismos apresentaram todos um crescimento microbiano estável que permitiu considerar, com segurança, que nestas percentagens o DMSO não representava toxicidade para os microrganismos em estudo.

Estes ensaios permitiram concluir que é possível utilizar o DMSO na percentagem de 4% na primeira concentração a testar na placa de 96 poços.

Assim, foi preparada uma solução mãe com 640 µl/ml de óleo essencial e com DMSO a 36 %, a partir dela foi realizada um diluição de 1:5 obtendo-se a solução de trabalho com 128 µl/ml de óleo essencial e com DMSO a 7,2 % que, após sofrer uma diluição de 1:2 nos poços da linha A da placa, ficou a 64 µl/ml de óleo essencial e com DMSO a 3,6%.

Considerações:

Mantendo as percentagens de DMSO aqui apresentadas, a emulsão do OE-EC não foi eficaz, pelo que este solvente foi apenas utilizado para emulsionar o OE-AV. Como acima de 4 % o DMSO se apresentou tóxico para os microrganismos em estudo, aumentar a sua dose não passaria por uma solução. Desta forma, foi necessário testar outro emulsionante (*Tween 20*) para o OE-EC.

Anexo 4 - Validação do método do Tween 20 como emulsionante e da resazurina como marcador do crescimento microbiano

Primeira parte

O Tween 20 foi adotado como emulsionante para o OE-EC pois o DMSO não se mostrou eficaz na emulsão do óleo essencial no meio de cultura líquido.

Desta forma, foi preparada uma solução de trabalho com o Tween 20 numa percentagem capaz de emulsionar a mistura e, posteriormente, foi testado se essa percentagem não seria tóxica para os microrganismos em estudo.

Microrganismos em estudo:

- *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538);
- *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 178970);
- *Enterococcus hirae* (ATCC 179954);
- *Streptococcus agalactiae* (ATCC 181324);
- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027);
- *Escherichia coli* (ATCC 8739);
- *Candida albicans* (ATCC 10231);
- *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404).

Percentagem de Tween 20 em teste: 4 %

Metodologia:

Em dois *ependorfs*, um para o meio MHB e outro para o RPMI, foram adicionados pela seguinte ordem 256 µl de OE-EC, 40 µl de Tween 20 e 704 µl de meio de cultura líquido. Os *ependorfs* foram deixados em repouso sobre a bancada do laboratório. Passados alguns minutos foi verificado que não houve separação de fases. Nesta mistura, o Tween 20 encontrava-se a 4 % e após a diluição de 1:2, sofrida na placa de 96 poços, ficou a 2 %.

De seguida, foram preparadas duas soluções com Tween 20 a 4 %, meio de cultura líquido, respetivo para cada microrganismo, e azeite, em substituição do óleo essencial na tentativa de gestão de recursos já que o foco deste estudo seria a resistência dos microrganismos ao Tween 20. Destas soluções, foram pipetados 100 µl ou 200 µl, mediante os microrganismos em estudo, para poços da placa, em duplicado para cada microrganismo, e foram adicionados controlos positivos (meio de cultura, azeite e microrganismo) e negativos (meio de cultura, azeite e Tween 20). Posteriormente, seguiu-se a preparação dos inóculos, inoculações na placa e incubação desta sob as condições necessárias para os respetivos microrganismos.

Resultados e Conclusões:

Após o período de incubação, não foi possível verificar o crescimento microbiano já que a coloração da mistura, dos poços da placa, não o permitiu. Desta forma, surgiu a necessidade de adicionar um marcador do crescimento microbiano.

Por outro lado, foi verificado que após os períodos de incubação a solução com o *Tween 20* a 4 % continuava emulsionada no poço.

Segunda parte

Foram preparadas duas soluções com meio de cultura líquido, uma de RPMI e outra de MHB, com resazurina a 0,0525 %. Destas, respetivamente, foram pipetados 20 µl para cada poço contendo os microrganismos e a placa foi colocada a incubar durante 4 horas. Em cada poço a resazurina ficou a 0,015 %.

Resultados e Discussão:

Findo este período de incubação, foi verificado que todos os poços alteraram de cor azul (cor da resazurina) para cor de rosa como resultado da conversão desta pelos microrganismos. Assim, e em comparação com os controlos positivos (cor de rosa) e com os controlos negativos (cor roxa), foi possível concluir que os microrganismos cresceram na presença de *Tween 20* a 2% e que a resazurina se mostrou como um composto possível de utilizar na marcação deste crescimento.

Considerações:

A resazurina é um composto fotossensível pelo que todo o material necessário para o seu manuseamento deve estar revestido por papel de alumínio.

Anexo 5 - Validação do método do DMSO como emulsionante do óleo essencial na análise da atividade citotóxica

De forma a testar qual a percentagem máxima de DMSO tolerada pelas células, a cultura celular de fibroblastos foi estimulada com diferentes concentrações de DMSO, ainda que, segundo a ISO/EN 10993-5, o DMSO surja recomendado numa percentagem de 0,5 % em solução.

Linha celular em estudo: 3T3 fibroblastos da pele

Percentagens de DMSO em teste: 10 %, 5 %, 2 %, 1 % e 0,5 %

Metodologia:

A metodologia aplicada seguiu as diretrizes do ensaio MTT descrito na ISO/EN 10993-5 e que, no capítulo 5 foi detalhado. As células foram colocadas a crescer numa placa estéril de 96 poços em poços reservados para os controlos negativos e para os estímulos, num total de n=5 para cada coluna de ensaio. Estas, posteriormente, foram estimuladas com as diferentes concentrações de DMSO e o seu crescimento foi analisado por ensaio MTT.

Considerações:

Apenas foram testados os fibroblastos, por uma gestão de recursos, e já que estes, de entre os dois tipos de culturas celulares em teste, são os mais sensíveis.

Resultados e Conclusões:

Na presença de 0,5 % e 1 % de DMSO as células apresentaram uma percentagem de viabilidade celular de 92,16 % e de 88,12 %, respetivamente, pelo que foi considerado que este composto se mostrava adequado para o estudo em questão.

Assim, de seguida, foi testado se nestas percentagens ele se mostrava capaz de, na proporção de 1:1, emulsionar o óleo essencial, OE-EC. Para isso, foi colocada num *falcon* de 15 ml uma mistura de meio completo, óleo essencial e DMSO a 1 %, sendo que o óleo essencial estava numa concentração de 10 µl/ml, ou seja, a 1 %. Verificou-se a ocorrência de uma emulsão perfeita, concluindo-se que na percentagem de 1 %, e desde que o óleo essencial também estivesse nesta mesma percentagem, o DMSO podia ser utilizado como emulsionante nos ensaios para a analisar a atividade citotóxica do óleo essencial.

Anexo 6 - Comunicações científicas apresentadas ao longo do desenvolvimento da dissertação

Ramos L., Oliveira A. S., Gaspar C., Martinez-de-Oliveira J., Delgado F., Palmeira-de-Oliveira A., *Antimicrobial activity of extracts of Cistus ladanifer: oil and hydrolate, which will be the most effective?*, NORMÉDICA AJUTEC, Porto, Portugal (Novembro, 2017).

Ramos L., Oliveira A. S., Gaspar C., Rolo J., Palmeira-de-Oliveira R., Martinez-de-Oliveira J., Delgado F., Palmeira-de-Oliveira A., *Evaluation of the aplicability of Cistus ladanifer essential oil, with antimicrobial activity, as a natural preservative of cosmetic formulations*, COSMETINNOV, Porto, Portugal (Março, 2018).

Ramos L., Gaspar C., Rolo J., Oliveira A.S., Vaz C., Palmeira-de-Oliveira R., Martinez-de-Oliveira J., Delgado F., Palmeira-de-Oliveira A., *Evaluation of the aplicability of Cistus ladanifer extracts as a cosmetic ingredients: determination of antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities*, XII Simpósio CICS-UBI, Covilhã, Portugal (Julho, 2018).

Palmeira-de-Oliveira A., **Ramos L.**, Vaz C., Gaspar C., Rolo J., Oliveira A.S., Palmeira-de-Oliveira R., Martinez-de-Oliveira J., Delgado F., *Toxicity assessment of Cistus ladanifer extracts: determination of cytotoxicity and antioxidant activity*, EUROTOX, Bruxelas, Bélgica (Setembro, 2018)*.

Ramos L., Gaspar C., Rolo J., Palmeira-de-Oliveira R., Martinez-de-Oliveira J., Delgado F., Palmeira-de-Oliveira A., *Evaluation of the aplicability of Cistus ladanifer essential oil as a cosmetic ingredient: determination of antimicrobial and antioxidant activities*, 30th IFCSS Congress, Munique, Alemanha (Setembro, 2018).

Ramos L., Palmeira-de-Oliveira, R., Vaz C., Gaspar, C., Oliveira, A. S., Rolo, J., Martinez-de-Oliveira, J., Delgado, F., Palmeira-de-Oliveira, A., *Applicability of Cistys ladanifer extracts in anti-aging cosmetic products*, 25th IFSCC CONFERENCE, Milão, Itália (Setembro, 2019).

*O abstrat foi publicado no “abstract book” ELSIVIER, Special Issue “Toxicology Letters”

