



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA



Ana Miguel Jorge Brenha

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE SUBPRODUTOS DE  
*THYMUS MASTICHINA* E *ORIGANUM VULGARE* COMO  
POSSÍVEIS INGREDIENTES EM RAÇÕES ANIMAIS**

Dissertação no âmbito do Mestrado em Segurança Alimentar, orientada pela  
Doutora Elisabete Coelho, pelo Professor Doutor Manuel António Coimbra  
e pelo Professor Doutor Fernando Ramos e apresentada  
à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Julho de 2018

Ana Miguel Jorge Brenha

Potencial antimicrobiano de subprodutos de *Thymus mastichina* e  
*Origanum vulgare* como possíveis ingredientes em rações animais

Dissertação no âmbito do Mestrado em Segurança Alimentar, orientada pela  
Doutora Elisabete Coelho, Professor Doutor Manuel António Coimbra, Universidade de Aveiro, e  
pelo Professor Doutor Fernando Ramos, Universidade de Coimbra, e apresentada  
à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Julho de 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

“The only source of knowledge is experience.”

**Albert Einstein**

## **Agradecimentos**

Gostaria de expressar o meu agradecimento a todas as pessoas e instituições que, de uma forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

Quero agradecer, em particular, à Doutora Elisabete Coelho pela sua orientação, disponibilidade, ajuda, apoio e experiência transmitida.

Ao Prof. Doutor Manuel António Coimbra e ao Prof. Doutor Fernando Ramos, obrigada pela orientação e ajuda que me disponibilizaram.

A todos os meus colegas do laboratório, o meu agradecimento pelo vosso companheirismo e boa disposição.

À Soraia, ao Daniel e ao Angelo, obrigada por toda a amizade, incentivo e conhecimento transmitido.

Às minhas amigas, Inês, Bia, Sofia e Raquel, obrigada por estarem sempre presentes.

Aos meus familiares, por todo o carinho. Em especial, aos meus pais e irmão, por todo o suporte, apoio, confiança e amor, absolutamente incondicionais.

A todos, o meu sincero muito obrigada!

## Resumo

Com vista à valorização dos subprodutos da indústria das plantas aromáticas, os caules de Tomilho Bela-luz (*Thymus mastichina*) e Orégãos (*Origanum vulgare*), recebidos na forma desidratada, foram estudados como fonte de compostos bioativos nomeadamente, compostos fenólicos totais e terpénicos, responsáveis pelos efeitos antimicrobianos descritos para estas plantas.

Com o objetivo de se obterem extratos ricos em compostos fenólicos foram efetuadas extrações com água, etanol:água e etanol aos subprodutos de Tomilho bela-luz dos anos 2016 e 2017 e Orégãos de 2017. Os extratos aquosos e hidroetanólicos do Tomilho Bela-luz 2016 foram os que obtiveram o maior teor de compostos fenólicos totais, 40 e 42 mg EAG/g caules, respetivamente. O extrato hidroetanólico dos Orégãos foi o que apresentou uma maior atividade antioxidante, 5 mM de equivalentes de Trolox/g caules, determinada pelo método ABTS, tendo sido o que também apresentou uma maior concentração de açúcares totais, 619 µg/mg.

Com o objetivo de se avaliar os subprodutos quanto ao seu teor em óleos essenciais, recorreu-se a dois tipos de hidrodestilação. Na hidrodestilação convencional, os caules foram submersos em água e o aquecimento foi feito por convecção; na hidrodestilação assistida por micro-ondas, os caules foram reidratados e escorridos e o aquecimento foi feito por irradiação de micro-ondas. Os rendimentos e composição dos óleos essenciais obtidos dos diferentes subprodutos foram semelhantes (0,03%). Os óleos essenciais são constituídos maioritariamente por monoterpenóides e sesquiterpenóides, sendo o carvacrol (17%, 12% e 17% no Tomilho Bela-luz 2016 e 2017 e Orégãos, respetivamente) e o timol (1%, 0,3% e 11% no Tomilho Bela-luz 2016 e 2017 e Orégãos, respetivamente) os compostos maioritários para todas as espécies. Os óleos essenciais foram testados contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella enterica* F2, tendo sido a *S. aureus* a espécie que apresentou maior suscetibilidade em todos os óleos essenciais testados. O crescimento bacteriano foi totalmente inibido com 2 µL de óleo essencial (60, 42 e 52 µg de carvacrol e 4, 1 e 34 µg de timol, no Tomilho Bela-luz 2016 e 2017 e Orégãos, respetivamente) e com uma concentração 4 vezes inferior verificaram-se halos de inibição (3, 2 e 3 cm no Tomilho Bela-luz 2016 e 2017 e Orégãos, respetivamente) similares aos dos antibióticos, ciprofloxacina e gentamicina. Para a *E. coli* e *S. enterica* F2 só se verificaram halos de inibição com 10 µL de óleo essencial.

Os subprodutos de Tomilho Bela-luz e Orégãos têm potencial para serem incorporados em rações animais pois demonstraram atividade antimicrobiana e antioxidante contra as principais espécies infecciosas em aves.

**Palavras-chave:** Óleos essenciais, subprodutos ervas aromáticas, atividade antimicrobiana, atividade antioxidante, Orégãos, Tomilho Bela-luz

## Abstract

This thesis aimed the valuation of by-products resultant from aromatic plant industry, specifically stems from Thyme “Bela-luz” (*Thymus mastichina*) and from Oregano (*Origanum vulgare*). These matrices, supplied on a dried state, were evaluated as potential sources of bioactive compounds namely, total phenolics and terpenic compounds that are often associated to the antimicrobial effects described for these plants.

With the objective to obtain extracts rich in phenolic compounds, solid-liquid extractions were performed on Thyme from the harvesting seasons of 2016 and 2017 and Oregano from 2017, using water, ethanol:water and ethanol. The aqueous and hydroethanolic Thyme 2016 extracts were those that obtained the highest content of total phenolic compounds, 40 and 42 mg EAG/g stems, respectively. The Oregano’s hydroethanolic extract was the one that revealed the higher antioxidant activity, 5 mM of Trolox/g stems determined by ABTS methodology, being also the one that presented the higher overall sugar content, 619 µg/mg.

In order to evaluate these by-products as sources of essential oils, two types of hydrodistillation processes were analyzed. For the conventional hydrodistillation, the by-products were submerged in water and the heating source was applied by convection; for the microwave-assisted hydrodistillation, the stems were rehydrated, drained and the heating was performed by microwave irradiation. The extraction yields and composition of the essential oils from the different by-products were similar (0.03%). The essential oils were composed mainly by monoterpenoids and sesquiterpenoids, with carvacrol (17%, 12% e 17% in Thyme 2016 and 2017 and Oregano, respectively) and thymol (1%, 0.3% e 11% in Thyme 2016 and 2017 and Oregano, respectively) as the major compounds on both species. The essential oils were tested against *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* F2 and *Staphylococcus aureus*, being the latter the most susceptible species for all tested essential oils. The bacterial growth was totally inhibited with 2 µL of essential oil (60, 42 and 52 µg of carvacrol and 4, 1 and 34 µg of thymol, in Thyme 2016 and 2017 and Oregano, respectively). With a lower concentration, 4-fold, the obtained inhibition halos were 3, 2 and 3 cm in Thyme 2016 and 2017 and Oregano, respectively, being similar to those of antibiotics, ciprofloxacin and gentamicin. For *E. coli* and *S. enterica* F2 the inhibition halos were only observed through the application of 10 µL of essential oil.

The Thyme and Oreganos by-products showed the potential to be incorporated in animal feed as those were revealed antimicrobial and antioxidant activity against the main poultry’s infectious species.

**Keywords:** Essential oils, aromatic herbs by-products, antimicrobial activity, antioxidant activity, Oregano, Thyme “Bela-luz”



# Índice Geral

Índice de Tabelas .....	xi
Índice de Figuras .....	xii
Lista de Abreviaturas.....	xiv
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Plantas aromáticas.....	1
1.1.1. Caracterização geral da espécie <i>Thymus mastichina</i> .....	1
1.1.2. Caracterização geral da espécie <i>Origanum vulgare</i> .....	3
1.2. Indústria de plantas aromáticas e subprodutos .....	5
1.3. Óleos essenciais .....	6
1.4. Atividades biológicas.....	11
1.4.1. Propriedades antioxidantes .....	11
1.4.2. Atividade antimicrobiana .....	12
1.5. Incorporação de antibióticos nas rações animais e resistência antimicrobiana ....	13
1.6. Objetivos.....	17
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	18
2.1. Amostras de subprodutos.....	18
2.2. Reagentes .....	18
2.3. Extração de compostos solúveis em água e etanol .....	19
2.3.1. Compostos Fenólicos Totais.....	19
2.3.2. Análise de carboidratos .....	20
2.3.2.1. Açúcares totais.....	20
2.3.2.2. Açúcares livres .....	21
2.3.2.3. Análise dos acetatos de alditol no GC-FID .....	21
2.3.2.4. Ácidos urónicos .....	21
2.4. Extração dos óleos essenciais .....	22
2.4.1. Hidrodestilação convencional .....	23
2.4.2. Hidrodestilação assistida por micro-ondas.....	24

2.5.	Extração líquido-líquido dos hidrodestilados com solventes orgânicos .....	24
2.6.	Análise dos óleos essenciais por GC-MS .....	25
2.7.	Atividades biológicas .....	26
2.7.1.	Atividade antioxidante dos extratos aquoso, hidroetanólico e etanólico .....	26
2.7.2.	Atividade antimicrobiana .....	27
2.7.2.1.	Microrganismos .....	27
2.7.2.2.	Meios de cultura: Luria Bertuni, Luria Bertuni com Agar e Mueller Hinton	27
2.7.2.3.	Preparação dos meios de cultura e inoculação das placas .....	27
2.8.	Análise estatística .....	28
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	29
3.1.	Extração dos compostos solúveis em soluções aquosas e etanólicas .....	29
3.1.1.	Quantificação do teor de compostos fenólicos .....	30
3.1.2.	Análise de carboidratos .....	33
3.1.3.	Avaliação da atividade antioxidante .....	36
3.1.4.	Avaliação da atividade antimicrobiana .....	37
3.2.	Extração dos óleos essenciais por diferentes métodos extrativos: hidrodestilação convencional e hidrodestilação assistida por micro-ondas .....	39
3.3.	Extração do óleo essencial do Tomilho Bela-luz 2016 obtido com diferentes solventes na extração líquido-líquido .....	47
3.4.	Atividade antimicrobiana .....	50
4.	CONCLUSÃO .....	54
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	55

## Índice de Tabelas

Tabela I – Identificação e composição do óleo essencial de várias espécies de <i>Thymus</i> em vários países .....	8
Tabela 2 – Identificação e composição do óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i> em vários países .....	9
Tabela 3 – Composição dos açúcares totais e monossacarídeos, em % molar, e concentração (m/m) (µg/mg) nas diferentes amostras.....	34
Tabela 4 – Concentração dos compostos fenólicos totais (µg EAG/mg extrato) e da concentração do total de açúcares totais e monossacarídeos (µg/mg) para as diferentes espécies de subprodutos .....	35
Tabela 5 – Identificação dos compostos voláteis (µg de composto/mg de óleo essencial) dos subprodutos de Tomilho Bela-luz, 2016 e 2017, e Orégãos obtidos por hidrodestilação convencional e hidrodestilação assistida por micro-ondas .....	43
Tabela 6 – Identificação dos compostos voláteis (µg de composto/mg de óleo essencial) do óleo essencial de Tomilho Bela-luz 2016 obtidos por hidrodestilação convencional e com separação do hidrodestilado por extração líquido-líquido com diferentes solventes orgânicos, diclorometano (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ) e <i>n</i> -hexano (C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> ).....	49
Tabela 7 – Halo de inibição, em cm, das amostras e dos antibióticos testados contra a <i>S. aureus</i> .....	50
Tabela 8 – Halo de inibição (cm) dos antibióticos e dos óleos essenciais de Tomilho Bela-luz 2017 e Orégãos, contra as estirpes <i>E. coli</i> ATCC 25922 e <i>Salmonella enterica</i> sv Anatum SF2 .....	52

## Índice de Figuras

Figura I – Distribuição do <i>Thymus mastichina</i> em Portugal Continental.....	2
Figura 2 – Tomilho Bela-luz em folhas.....	3
Figura 3 – Distribuição do <i>Origanum vulgare</i> em Portugal Continental .....	4
Figura 4 – Orégãos em folhas.....	4
Figura 5 – Proposta de formação do timol e carvacrol em <i>Origanum vulgare</i> e <i>Thymus</i> .....	11
Figura 6 – Amostra dos subprodutos de Tomilho Bela-luz.....	18
Figura 7 – Extração dos compostos solúveis em diferentes solventes, água, etanol e etanol:água (50:50) .....	19
Figura 8 – Obtenção dos hidrodestilados por hidrodestilação convencional .....	23
Figura 9 – Obtenção dos hidrodestilados por hidrodestilação assistida por micro-ondas.....	24
Figura 10 – Rendimento das extrações aquosas, hidroetanólicas e etanólicas do Tomilho Bela-luz 2016 e 2017 e Orégãos .....	29
Figura 11 – Quantidade total de compostos fenólicos totais ( $\mu\text{g}$ EAG/mg extrato) para as diferentes espécies dos subprodutos.....	31
Figura 12 – Quantidade total de compostos fenólicos totais (mg EAG/g caules) para as diferentes espécies dos subprodutos.....	32
Figura 13 – Atividade antioxidante quantificada nos vários extratos de Tomilho Bela-luz 2016 e 2017 e Orégãos, expressa em Equivalentes em Trolox (mM) por g de extrato .....	36
Figura 14 – Resultados dos testes antimicrobianos dos extratos obtidos das macerações (10 $\mu\text{L}$ ) do Tomilho Bela-luz 2016, do Tomilho Bela-luz 2017 e Orégãos, contra as estirpes <i>S. aureus</i> ATCC 6538, <i>Salmonella enterica</i> sv Anatum SF2 e <i>E.coli</i> ATCC 25922.....	38
Figura 15 – Rendimento do óleo essencial por g de caules das extrações realizadas por hidrodestilação convencional e hidrodestilação assistida por micro-ondas.....	39
Figura 16 – Cromatograma do perfil dos compostos voláteis dos óleos essenciais de Tomilho Bela-luz 2017 e dos Orégãos obtidos por hidrodestilação assistida por micro-ondas .....	41
Figura 17 – Rendimento do óleo essencial por g de caules das extrações realizadas por hidrodestilação convencional e extração líquido-líquido com diferentes solventes .....	47

Figura 18 – Resultados dos testes antimicrobianos dos óleos essenciais, com uma concentração de 0,5 $\mu$ L de OE, dos vários subprodutos contra a <i>S. aureus</i> .....	50
Figura 19 – Resultados dos testes antimicrobianos dos óleos essenciais, em várias concentrações, do Tomilho bela-luz 2017 e Orégãos contra as estirpes <i>E. coli</i> ATCC 25922 e <i>Salmonella enterica</i> sv Anatum SF2 .....	51

## Lista de Abreviaturas

<b>ABTS</b>	Ácido 2,2'-azino-bis-[3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico]
<b>Ara</b>	Arabinose
<b>EAG</b>	Equivalentes em Ácido Gálico
<b>Extrato EtOH</b>	Extrato etanólico
<b>Extrato EtOH:H<sub>2</sub>O</b>	Extrato hidroetanólico (50:50)
<b>Extrato H<sub>2</sub>O</b>	Extrato aquoso
<b>Gal</b>	Galactose
<b>GC-FID</b>	Cromatografia em fase gasosa com detetor de ionização de chama
<b>GC-MS</b>	Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa
<b>Glc</b>	Glucose
<b>Gram (+)</b>	Bactérias Gram-positivas
<b>Gram (-)</b>	Bactérias Gram-negativas
<b>LA</b>	Meio de cultura Luria Bertuni com Agar
<b>LB</b>	Meio de cultura Luria Bertuni
<b>Man</b>	Manose
<b>MH</b>	Meio de cultura Mueller Hinton
<b>OE</b>	Óleo essencial
<b>PAM</b>	Plantas aromáticas e medicinais
<b>TEAC</b>	Capacidade antioxidante em equivalentes de Trolox
<b>Trolox</b>	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico
<b>UA</b>	Ácidos urónicos
<b>Xyl</b>	Xilose

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Plantas aromáticas

As plantas aromáticas e medicinais (PAM) da família *Lamiaceae* abrangem uma enorme quantidade de espécies, das quais fazem parte o Tomilho Bela-luz (*Thymus mastichina*) e o Orégãos (*Origanum vulgare*), que podem ser aplicadas nas indústrias alimentar, farmacêutica, química e cosmética, através de substâncias ativas ou de óleos essenciais, devido ao seu teor em compostos bioativos, resultante da diversidade e dos teores em compostos fenólicos e terpênicos que contêm (Gabinete de Planeamento e Políticas, 2013).

Desde cedo que as qualidades odoríferas de algumas plantas começaram a ser notadas e aproveitadas pelo Homem. Desta maneira, a relação Homem-Plantas já é bastante antiga, estando o seu uso fortemente documentado em culturas antigas como no Antigo Egipto, Grécia, Índia e China.

De um modo geral, pode entender-se por plantas aromáticas como extratos frescos ou secos de produtos vegetais, cujo a sua aplicabilidade está não só diretamente relacionada com fins alimentares, pela sua capacidade de transmissão de cor, sabor e odor aos alimentos, mas também em outros sectores, que hoje em dia são igualmente importantes como a perfumaria, cosmética, e áreas nutracêuticas e farmacêuticas (Peter, 2012).

A flora Portuguesa é cada vez mais reconhecida pela sua diversidade em PAM. Das cerca de 3800 espécies vegetais, conhecidas em Portugal Continental e nas ilhas Açores e Madeira, aproximadamente 500 espécies são aromáticas e/ou medicinais.

As plantas aromáticas são mundialmente reconhecidas e utilizadas em várias indústrias, nomeadamente na indústria alimentar, para dar sabor aos alimentos, na perfumaria e cosmética, e na farmacêutica, devido às propriedades antioxidantes e antimicrobianas que lhes estão associadas, desempenhando assim um papel de grande importância em todos estes setores (Figueiredo, Barroso, & Pedro, 2007).

### 1.1.1. Caracterização geral da espécie *Thymus mastichina*

A planta aromática *Thymus mastichina* pertence à família *Lamiaceae*, subfamília *Nepetoideae* e género *Thymus*. As primeiras evidências do uso deste género de planta aromática datam do primeiro século AC. Hoje em dia, são conhecidos deste género cerca de 214 espécies, entre as quais a *Thymus mastichina*, contando de forma geral com 36 subespécies. O principal emprego desta planta está

relacionado com a confeção e processamento alimentar, onde de forma primária se procura fazer uso do seu odor e sabor, no entanto de forma adicional são conhecidas propriedades benéficas suplementares como as suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas (Peter, 2012).

Vulgarmente conhecido como Tomilho Bela-luz ou Tomilho Sal-puro, Tomilho-alvadio-do-Algarve, o *Thymus mastichina* está muito distribuído pela Península Ibérica e é facilmente encontrado em Portugal Continental, de norte a sul, em matos, matagais, terrenos baldios, entre outros (Jardim Botânico, 2018b). O Tomilho Bela-luz é uma planta muito aromática, sendo a folha, utilizada em culinária, como condimento e aromatizante, e como erva medicinal. O óleo essencial é empregado nas áreas da fitoterapia, cosmética e perfumaria e o extrato na fitoterapia e cosmética (Ferreira et al., 2012).



Figura 1 - Distribuição do *Thymus mastichina* em Portugal Continental ([https://jb.utad.pt/especie/Thymus\\_mastichina](https://jb.utad.pt/especie/Thymus_mastichina), acessado em 3/2/18)

Quanto à descrição da espécie *Thymus mastichina* esta é constituída por pequenos arbustos vivazes, amoitados, que podem chegar até aos 50 cm, com caules mais ou menos pubescentes. As folhas são pequenas e a corola esbranquiçada com, aproximadamente, 5 mm. O período mais favorável para a



sua floração é desde a primavera até ao verão (Ferreira et al., 2012).



Figura 2 - Tomilho Bela-luz em folhas (<http://www.ervital.pt/>, acessado em 3/2/18)

#### 1.1.2. Caracterização geral da espécie *Origanum vulgare*

O género *Origanum*, pertence à família *Lamiaceae*, e consiste em 43 espécies, do qual faz parte a planta aromática *Origanum vulgare*, sendo a espécie em maior abundância dentro do género. Esta espécie é oriunda do médio oriente e foi introduzida na Europa no século XVI. Todas as espécies deste género desempenham um papel primordial entre as ervas usadas para a culinária no comércio mundial, estando comercialmente disponíveis. Ainda assim, e apesar da sua importância económica, dominam o mercado europeu das ervas aromáticas, é uma espécie que ainda é muito subestimada uma vez que, os seus recursos genéticos e variabilidade ainda não foram completamente explorados (Gabinete de Planeamento e Políticas, 2013; Peter, 2012; Pires & Delgado, 2013; Radušienė, Ivanauskas, Janulis, & Jakstas, 2008).

A planta *Origanum vulgare*, de nome comum Orégão-vulgar-do-Minho, Orégãos, Majerona-brava ou Manjerona-selvagem, está muito distribuída pela Região Mediterrânica e é facilmente encontrada em habitat ripícola (Jardim Botânico, 2018a). Esta planta é caracterizada pelo seu aroma e sabor picantes, aromáticos, perfumados, penetrantes, que lembram a lavanda, e um sabor ligeiramente amargo (Peter, 2012). As principais aplicações desta espécie são, em forma de planta, em condimento, licores e fitoterapia, o óleo essencial extraído das folhas, nas áreas da cosmética, fitoterapia e perfumaria, e, o extrato da folha em cosmética e perfumaria (Ferreira et al., 2012).



*Figura 3 - Distribuição do Origanum vulgare em Portugal Continental*  
([https://jb.utad.pt/especie/Origanum\\_vulgare\\_subesp\\_vulgare](https://jb.utad.pt/especie/Origanum_vulgare_subesp_vulgare), acessado em 3/2/18)

A planta dos Orégãos tem uma altura que pode variar entre 25 a 40 cm, é herbácea, com caules subterrâneos, muito ramificada, produz folhas pequenas (1 a 5 cm), as flores são pequenas, apresentando cores como púrpura, rosa, branco ou uma mistura de todas, sendo o seu período de floração durante os meses de julho a setembro (Direção Geral da Saúde, 2015; Pires & Delgado, 2013).



*Figura 4 - Orégãos em folhas.* (<http://www.ervital.pt/>, acessado em 3/2/18)

## 1.2. Indústria de plantas aromáticas e subprodutos

As indústrias de plantas aromáticas geram subprodutos resultantes da sua atividade, que estão subaproveitados e que têm impacto económico e ambiental. Após a colheita das PAM estas podem ser usadas em fresco ou em seco, o que possibilita a conservação dos compostos bioativos por um tempo mais prolongado.

Após a colheita, dá-se a secagem, podendo ser realizada de forma natural ou artificial, recorrendo a secadores industriais convencionais. A secagem é o principal método de conservação de PAM, cujo principal objetivo é reduzir o teor de água, diminuindo os riscos de contaminação microbiológica e assim, preservar as suas características e aumentar o período de conservação à temperatura ambiente.

A separação entre as folhas e os caules dá-se por processos mecânicos. O material vegetal é colocado num crivo mecânico em que as folhas são separadas através da passagem sucessiva entre crivos de diferentes dimensões. Para uma separação mais seletiva, as folhas e os caules são colocados num separador de fluxo de ar, e as diferenças de peso ou estruturas em diferentes saídas da máquina, faz com que as folhas e os caules se separem.

As folhas são separadas em diferentes frações, de acordo com o objetivo final, ou são usadas para infusões ou como condimentos. As vias para a valorização dos subprodutos, como os caules, são a valorização material, em que é feita a reciclagem/recuperação dos subprodutos, como, por exemplo, para alimentação animal, a valorização orgânica, através da compostagem, e a valorização energética, para incineração (Alves, 2014; Associação Empresarial de Portugal, 2011; Ferreira, 2014).

Contudo, os subprodutos podem ainda apresentar teores consideráveis de compostos bioativos com excelente atividade antibacteriana, podendo ser empregues em rações animais, com o intuito de substituir os antibióticos por agentes antibacterianos naturais, atendendo aos padrões de “consumo verde” e economia circular (Gavarić et al., 2015).

A crescente procura por plantas aromáticas resulta não só num aumento do comércio local, como ao nível do comércio internacional. Mundialmente, o mercado de PAM vale, aproximadamente, 83,000 milhões de dólares. Cerca de 80% das importações e exportações mundiais são atribuídas a apenas 12 países, destacando-se países asiáticos e europeus. O Japão e a República da Coreia são os principais consumidores de PAM, já a China e a Índia são os principais produtores mundiais, e Hong Kong, EUA e Alemanha destacam-se por serem os mais importantes centros comerciais do mundo. Na Europa, devido à sua longa tradição no uso de plantas, cerca de 2,000 espécies de plantas aromáticas e medicinais são utilizadas no comércio (Gabinete de Planeamento e Políticas, 2013;

Lange, 2004).

Em Portugal, devido às condições edafoclimáticas com influência do clima Mediterrânico, que favorece bastante este tipo de culturas, há uma grande procura e valorização por este tipo de plantas devido à sua intrínseca riqueza em óleos essenciais (Ferreira et al., 2012).

A dinâmica e a produção de milhares de toneladas de PAM, implica que se encontrem soluções face à pegada ambiental do sector de forma a garantir padrões sustentáveis de consumo e produção. A implementação da Agenda 2030 das Nações Unidas, visa a adoção de práticas que favoreçam a gestão sustentável e o uso eficiente dos recursos naturais, reduzir consideravelmente a produção de resíduos através da prevenção, redução, reciclagem e reutilização, e apoiar os países em desenvolvimento a fortalecer a sua capacidade científica e tecnológica para avançar em direção a padrões mais sustentáveis de consumo e produção (United Nations, 2018b).

Face a esta necessidade de fontes renováveis de produtos agroindustriais, bem como a necessidade de proteger a biodiversidade vegetal faz com que atualmente haja uma crescente expansão no mercado de subprodutos das PAM. Muitos agricultores estão cada vez mais interessados não só numa produção sustentável, bem como em agregar valor às suas culturas já existentes, utilizando resíduos agrícolas ou convertendo os subprodutos das culturas em novos usos (Ferreira et al., 2012; Lubbe & Verpoorte, 2011).

### 1.3. Óleos essenciais

Os óleos essenciais são providos de aroma, apresentando, geralmente, um odor agradável, intenso e um aspeto oleoso, sendo os responsáveis pelas características odoríferas das plantas aromáticas e medicinais. São, ainda, misturas complexas, sendo a sua maior característica a volatilidade, e solúveis em solventes apolares, como o diclorometano ou o *n*-hexano.

Os óleos essenciais, sendo compostos com baixo peso molecular, biodegradáveis, capazes de atravessarem a barreira hemato-encefálica, que normalmente não revelam toxicidade e com propriedades antioxidantes e antimicrobianas, constituem um dos maiores grupos de matérias-primas para as indústrias alimentares, na produção de alimentos e bebidas, de perfumaria, como aromatizantes, e as farmacêuticas, na produção de cosméticos, devido às suas propriedades sensoriais e medicinais. Cerca de 90% da produção global de óleo essencial é usada por estas indústrias devido aos seus aromas e fragâncias (Lubbe & Verpoorte, 2011; Rodrigues, 2014; Silva, 2014).

Os óleos essenciais estão presentes em todas as partes da planta (flores, folhas, sementes, cascas, caules, raízes, madeira e frutos), sendo utilizados para a elaboração de diversos produtos devido à sua ação terapêutica. Contudo, as folhas são as partes mais utilizadas e onde os óleos essenciais se encontram em maiores concentrações, apresentando um rendimento em óleo essencial de 3,1%, enquanto que os caules contêm um rendimento de 1,1%.

Também são a parte das plantas que se encontram mais expostas aos fatores adversos, como predadores, condições ambientais, entre outros, e por esta mesma razão, produzem grandes quantidades de metabolitos secundários, à qual pertence uma grande diversidade de compostos, tais como compostos terpênicos, nomeadamente carvacrol e timol, característicos do género *Thymus* e *Origanum*, e compostos fenólicos (derivados dos ácidos fenólicos, flavonoides, tocoferóis, entre outros), e que apesar de não serem necessários para o desenvolvimento e crescimento da planta, são fundamentais para a sua proteção (Carvalho, 2012; Ngioni et al., 2006; Peter, 2012; Rodrigues, 2014).

As partes usadas da espécie *Thymus* são os ramos foliares e as sumidades floridas. Relativamente à produtividade do género *Thymus vulgaris*, a planta fresca apresenta um rendimento de 4-5 t/ha, a planta seca e a folha seca apresentam um rendimento de 1,5-2,5 e 0,8-1,2 t/ha, respetivamente, e o óleo essencial 20-25 kg/ha (1-3% na planta seca). Neste mesmo género, as partes aéreas floridas apresentaram como principais constituintes, o timol, carvacrol, geraniol, terpineol e linalol. Os óleos essenciais de Tomilho apresentam grande polimorfismo podendo encontrar-se diferentes quimiotipos, podendo o seu material vegetal seco conter um rendimento de 1 a 2,5% em óleo essencial (Ferreira et al., 2012; Peter, 2012).

Nos Orégãos as partes utilizáveis são as folhas e sumidades floridas. Quanto ao rendimento os Orégãos podem ter um rendimento de 15t/ha na planta fresca, 3,75 t/ha na planta seca e no óleo essencial 30 kg/ha (0,2 a 1% na planta fresca florida). O óleo essencial, extraído da planta seca, apresentaram como principais constituintes o carvacrol (14,5%), o timol (12,6%), álcool  $\beta$ -fenchílico (12,8%), o  $\gamma$ -terpineno (11,6%) e o  $\delta$ -terpineol (7,5%) (Ferreira et al., 2012; Silva, Duarte-Almeida, Perez, & Franco, 2010; Peter, 2012).

A composição dos óleos essenciais da mesma espécie, podem sofrer variações tanto em termos quantitativos, como em termos qualitativos independentemente da região do mundo onde se encontram (Tabela 1 e 2).

Tabela 1 – Identificação e composição do óleo essencial de várias espécies de *Thymus* em vários países

Espécie e origem da planta	Técnicas utilizadas	Compostos identificados	Referências Bibliográficas
<i>T. vulgaris</i> Espanha	Hidrodestilação e GC-MS	1,8-cineol (29-36%) acetato de terpenilo (18–25%) borneol (4,3-4,6%) linalol (1,57-3,7%) $\beta$ -pineno (2,3-3,6%) $\alpha$ -terpineol (2,4-3%) cânfora (1,7-2,1%)	(Jordán, Martínez, Goodner, Baldwin, & Sotomayor, 2006)
<i>T. vulgaris</i> Itália	Hidrodestilação e GC-MS	timol (19-54%) carvacrol (1,4-2,6%) <i>p</i> -cimeno (11,6-21,5%) $\gamma$ -terpineno (1,4-16,8%)	(Hudaib, Speroni, Pietra, & Cavrini, 2002)
<i>T. vulgaris</i> Lituânia	Destilação em aparelho de Likens-Nickerson, “headspace” dinâmico e GC e GC-MS	timol <i>p</i> -cimeno $\gamma$ -terpineno linalol carvacrol	(Venskutonis, 1997)
<i>T. vulgaris</i> Turquia	Hidrodestilação e GC-MS	timol (46,2%) $\gamma$ -terpineno (14,1%) <i>p</i> -cimeno (9,9%) linalol (4,0%) mirceno (3,5%) $\alpha$ -pineno (3,0%) $\alpha$ -tujona (2,8%)	(Özcan & Chalchat, 2004)
<i>T. kotschyanus</i> Irão	Hidrodestilação e GC-MS	timol (38,6%) carvacrol (33,9%) $\gamma$ -terpineno (8,2%) <i>p</i> -cimeno (7,3%)	(Nickavar, Mojab, & Dolat-Abadi, 2005)
<i>T. capitatus</i> Tunísia	Hidrodestilação e GC	carvacrol (53,7%) $\gamma$ -terpineno (11,6%) <i>p</i> -cimeno (10%)	(Hedhili, Romdhane, Planche, & Abderrabba, 2005)

Tabela 2 - Identificação e composição do óleo essencial de *Origanum vulgare* em vários países

Origem da Planta	Técnicas utilizadas	Compostos identificados	Referências bibliográficas
Grécia	Hidrodestilação e espectrometria Raman com transformada de Fourier	carvacrol (8,6–80,8%) timol (1,8–63,7%) <i>p</i> -cimeno (5,2–13,0%) $\gamma$ -terpineno (5,8–7,5%)	(Daferera, Tarantilis, & Polissiou, 2002)
Lituânia	Hidrodestilação e GC-MS e GC-FID	$\beta$ -ocimeno (10,8–21,6%) germacreno D (7,5–29,4%) $\beta$ -cariofileno (2,3–16,6%) sabineno (2,1–15,0%)	(Mockute, Bernotiene, & Judzentiene, 2001)
Índia	Hidrodestilação e GC-MS e GC-FID	timol (0–82,0%); carvacrol (0–27,4%) germacreno D (trace–13,3%) germacreno D-4-ol (0–9,5%) $\beta$ -cariofileno (0,4–8,8%)	(Bisht, Chanotiya, Rana, & Semwal, 2009)
Polónia	Hidrodestilação e GC-MS	carvacrol (3,6–9,1 g/kg) timol (2,14–8,44 g/kg) $\gamma$ -terpineno (1,5–4,9 g/kg)	(Figiel, Szumny, Gutiérrez-Ortíz, & Carbonell-Barrachina, 2010)
Itália	Hidrodestilação e GC-MS e GC-FID	timol (7,9–55,5%) carvacrol (0,3–56,6%) $\gamma$ -terpineno (12,6–32,6%) <i>p</i> -cimeno (3,6–9,7%) éter metílico de carvacrol (1,9–4,7%)	(Russo, Galletti, Bocchini, & Carnacini, 1998)
Turquia	Hidrodestilação e GC-MS	cariofileno (14,4%) espatulenol (11,6%) germacreno-D (8,1%) $\alpha$ -terpineol (7,5%) óxido de cariofileno (5,8%)	(Sahin et al., 2004)

As variabilidades verificadas entre o mesmo género de planta são devidas a fatores intrínsecos e extrínsecos, que estão inter-relacionados uns com os outros, influenciando-se e comprometendo o rendimento e a composição do óleo essencial das PAM. Os fatores intrínsecos são inerentes à planta e relacionam-se com a interação desta com o ambiente (tipo de solo, clima, entre outros) e a maturidade da planta (Dhifi, Bellili, Jazi, Bahloul, & Mnif, 2016; Martins, Nogueira, Costa, & Salgueiro, 2012). Os fatores extrínsecos estão relacionados com o meio onde a planta está localizada. Um dos fatores extrínsecos diz respeito ao stress hídrico a que a planta está sujeita. A diminuição do teor de água no solo afeta acentuadamente alguns processos ao nível da anatomia, fisiologia e bioquímica da planta, como a diminuição da área foliar e crescimento do caule, fechamento dos estomas, acumulação de carboidratos nas raízes, entre outros mecanismos de defesa. O excesso do

teor de água no solo faz com que a planta adote mecanismos de defesa como fechamento dos estomas, enrolamento da folha, enraizamento rápido e profundo, entre outros (Broetto, Gomes, & Joca, 2017). O stress hídrico tem um efeito negativo sobre a maioria das características morfológicas da planta, mas em termos de rendimento de óleo essencial é um fator positivo. O stress hídrico aumenta a concentração de óleo essencial uma vez que, para a planta resistir ao stress, usa diferentes mecanismos, que leva à produção de mais metabolitos secundários e as substâncias impedem a oxidação nas células (Farahani, Valadabadi, Daneshian, & Khalvati, 2009).

Do ponto de vista químico, os óleos essenciais das plantas são constituídos principalmente por uma mistura de compostos terpênicos ou terpenóides, nomeadamente terpenos, terpenóis, óxidos pirânicos e furânicos de terpinóis. Os terpenos são hidrocarbonetos, compostos formados apenas por hidrogénio e carbono, são apolares, insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos (Balasundram, Sundram, & Samman, 2006; Dewick, 2009; Wink, 2010).

Os compostos terpênicos são apolares devido à cadeia carbonada, mas o grau de polaridade varia entre os compostos, devido à existência de grupos polares como aldeídos, carboxilos, hidroxilos e cetonas, dependendo, também, do tamanho da cadeia. Podem ser subdivididos em várias classes de acordo com o número de átomos de carbono, isto é, de unidades isoprénicas. A classe denominada de terpenos têm a fórmula geral  $(C_5H_8)_n$ , e podem ser constituídos por cadeias abertas ou fechadas. Os principais constituintes dos óleos essenciais são os monoterpenóides ( $C_{10}$ ), constituídos por duas unidades isoprénicas ligadas entre si, e os sesquiterpenóides ( $C_{15}$ ), constituídos por três unidades isoprénicas (Bakkali, Averbeck, Averbeck, & Idaomar, 2008; Santos, 2010; Silva, 2014).

O carvacrol, de nome IUPAC 2-metil-5-(1-metiletil)-fenol, e o isómero timol (5-metil-2-(1-metiletil)-fenol) são monoterpenóis aromáticos encontrados em diversas plantas aromáticas, sendo os compostos maioritários dos óleos essenciais do género *Thymus* e *Origanum*, biossintetizados a partir do  $\gamma$ -terpineno e do *p*-cimeno (Erlangung, 1977; Nostro & Papalia, 2012). O carvacrol e o timol são estruturalmente muito semelhantes variando apenas a posição do grupo hidroxilo no anel fenólico (Lambert, Skandamis, Coote, & Nychas, 2001).

O geranyl difosfato é convertido por monoterpeno-sintases a produtos cíclicos ou acíclicos, sendo formados, a partir destes produtos, monoterpenos oxigenados através de reações catalisadas frequentemente pelas monooxigenases do citocromo P450s. A biossíntese do timol e carvacrol começa com a formação do  $\gamma$ -terpineno, dando origem ao composto aromático *p*-cimeno (figura 5). Os monoterpenóis aromáticos, timol e carvacrol, são derivados a partir dos produtos cíclicos iniciais,  $\gamma$ -terpineno, catalisados através do citocromo P450s (Erlangung, 1977).



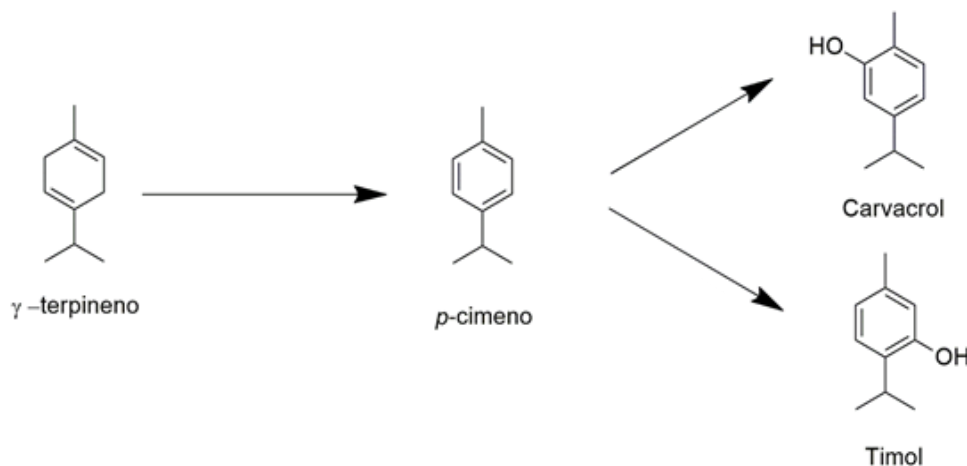


Figura 5 – Proposta da formação do timol e carvacrol em *Origanum* e *Thymus*. Adaptado de Erlangung, 1977

## 1.4. Atividades biológicas

### 1.4.1. Propriedades antioxidantes

Os compostos fenólicos têm recebido grande destaque devido aos seus inúmeros efeitos benéficos, nomeadamente os efeitos antioxidantes (Shan, Cai, Sun, & Corke, 2005; Sousa et al., 2007).

Do ponto de vista químico, designam-se por compostos fenólicos aqueles que possuem um anel aromático com pelo menos um grupo hidroxilo como substituintes, ou seja, um grupo fenol. Estes variam de simples moléculas a compostos complexos com elevados pesos moleculares, mas apesar da sua diversidade estrutural são muitas vezes referidos como polifenóis (Balasundram et al., 2006).

A grande parte da atividade antioxidante associada às plantas da família *Lamiaceae* é devido à presença de compostos fenólicos (Direção Geral da Saúde, 2015; Guarda, Rubilar, Miltz, & Galotto, 2011). Na espécie *Thymus vulgaris L.*, os principais compostos fenólicos,  $10,17 \pm 0,01$  g EAG/100 g de peso seco, detetados foram os ácidos fenólicos, como o ácido gálico, o ácido cafeico e o ácido rosmarínico, monoterpénóis, como o timol, diterpenos fenólicos e flavonoides. Na espécie *Origanum vulgare*, os compostos fenólicos maioritários, numa concentração de  $4,52 \pm 0,01$  g EAG/100 g de peso seco, são os ácidos fenólicos, como o ácido cafeico, o ácido *p*-cumárico, o ácido rosmarínico e derivados do ácido cafeico, fenóis voláteis, como o carvacrol, e flavonoides (Shan et al., 2005).

#### 1.4.2. Atividade antimicrobiana

A crescente tendência atual pela procura de produtos naturais por parte dos consumidores, resultado da crescente preocupação com a saúde, tem tornado necessário o estudo do uso de condimentos e ervas aromáticas como antioxidantes naturais em substituição aos convencionais antibióticos amplamente utilizados.

Devido ao grande consumo de antibióticos, os patogênicos à saúde humana estão, cada vez mais, a tornar-se resistentes. Por isso, a procura por antimicrobianos naturais eficientes no controle do crescimento de vírus e bactérias, tem aumentado (Shaaban, El-Ghorab, & Shibamoto, 2012).

Embora os óleos essenciais sejam bastante utilizados em vários setores industriais o seu uso em alimentos como substâncias antimicrobianas é ainda limitado devido à avaliação dos sabores uma vez que, doses eficazes contra microrganismos podem alterar as características organolépticas do produto logo, a aceitabilidade do mesmo pode ficar comprometida. Assim, um dos maiores desafios é conhecer as concentrações mínimas inibitórias dos óleos essenciais para que se consiga estabelecer um balanço entre a eficácia do produto como agente antimicrobiano e a aceitabilidade sensorial.

Os metabolitos secundários, como os compostos fenólicos e terpênicos, presentes nos óleos essenciais, são os principais responsáveis pela atividade antimicrobiana, tanto de bactérias Gram (+) como de Gram (-). Os compostos fenólicos devido à sua capacidade de se acumularem na bicamada lipídica, atuam em diferentes alvos bioquímicos dos microrganismos, suprimindo uma série de fatores, tais como, causam desarranjo na função e estrutura da membrana, penetrando a célula bacteriana, exercem atividade inibitória, que causa a lise celular e libertação do ATP, e ainda, há perda de constituintes celulares devido ao aumento da permeabilidade da membrana citoplasmática (Silva, Duarte-Almeida, Perez, & Franco, 2010).

Os óleos essenciais de *Thymus* e *Origanum* podem inibir algumas espécies de bactérias, tais como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, entre outras, estando a sua inibição diretamente relacionada com os compostos fenólicos, carvacrol e timol (Edris, 2007). O carvacrol e o timol, compostos hidrofóbicos que tendem a dissolver-se na membrana citoplasmática das células bacterianas, são compostos fenólicos que devido à sua atividade antimicrobiana já testada sobre bactérias, revelam elevado potencial para prolongar a vida útil e melhorar a segurança dos alimentos (Silva et al., 2010). O óleo essencial de *Thymus vulgaris*, composto maioritariamente pelo carvacrol (88,98%), mostrou ser o principal responsável pela atividade antimicrobiana, contra *Salmonella*, *E. coli* e *S. aureus*, sendo a *S. aureus* a mais suscetível, com uma concentração mínima inibitória de óleo essencial de 0,32 mg/mL (Abed et al., 2014). A atividade antimicrobiana do óleo essencial de Orégão

deve-se à sua grande concentração em carvacrol e timol e, ainda de outros compostos que se apresentam em menor quantidade, como o *p*-cimeno e o  $\gamma$ -terpineno, verificando-se um aumento dos halos de inibição, para o dobro, com o aumento da concentração do óleo essencial, 0,1 a 2% (Silva et al., 2010). O óleo essencial de Orégão, constituído maioritariamente pelo carvacrol (60,71%), foi testado contra a *S. aureus*, *Salmonella* e *E. coli*, tendo sido a *S. aureus* a que revelou um maior halo de inibição. No entanto, quando testada a concentração mínima inibitória do óleo essencial, não se verificaram diferenças entre a *S. aureus* e a *Salmonella* (0,01 mg/mL) (Ugalde et al., 2016).

### 1.5. Incorporação de antibióticos nas rações animais e resistência antimicrobiana

Desde a descoberta da grande maioria dos antibióticos, nas décadas de 1940 a 1960, que estes começaram a ser utilizados na produção animal tanto na forma profilática, como promotores do crescimento animal (AGPs – *Antibiotic Growth Promoters*), como na forma terapêutica, para o tratamento de infeções bacterianas uma vez que, a saúde dos animais é a base das indústrias agropecuárias. Por esta mesma razão, a segurança e qualidade alimentar deste setor industrial será mais efetiva com a redução da prevalência de infeções nos animais (Guimarães, Momesso, & Pupo, 2010; Ronquillo, Carlos, & Hernandez, 2016).

A administração dos antibióticos reduz a incidência de bactérias causadoras de doença, tanto por ação bacteriostática, inibindo o crescimento das bactérias no meio, como por ação bactericida, causando a morte de bactérias através de mecanismos como inibição irreversível do DNA. Outro dos objetivos com a incorporação de AGPs é a redução da espessura da parede intestinal que promove uma absorção mais eficiente de nutrientes. Contudo, a utilização de forma indevida e abusiva de antibióticos na criação animal começou a ser objeto de grande preocupação, pelos riscos dos resíduos medicamentosos nos produtos derivados dos animais e, particularmente, pela resistência bacteriana, tornando os patógenos cada vez mais resistentes, que uma vez transferidos para os seres humanos, podem causar infeções incuráveis (Bogaard & Stobberingh, 2000; Teuber, 2001; Visek, 1978).

Por esta mesma razão, o controlo do uso de antibióticos e proibição do seu emprego como promotores de crescimento na ração animal é uma realidade na Europa. Bem como a progressiva perceção negativa por parte dos consumidores ao uso de produtos artificiais na dieta dos animais tem impulsionado os estudos sobre aditivos alimentares com o objetivo de alimentos mais seguros e resultados satisfatórios na sanidade e produção animal (Carlson & Fangman, 2000).

O facto de se ter vindo a incorporar os antibióticos na alimentação do gado de forma abusiva, fez com

que a resistência antimicrobiana se tornasse um problema do século XXI. A resistência antimicrobiana é uma ameaça global para a saúde pública, para a segurança e qualidade alimentar, assim como para a vida, a produção animal e o desenvolvimento económico e agrícola, devido tanto ao uso adequado como inadequado de antibióticos, utilizados na saúde animal (United Nations, 2018a).

A maioria dos antimicrobianos atuam especificamente na parede celular das bactérias, penetrando na célula do microrganismo, atingindo os processos metabólicos essenciais à vida e ao desenvolvimento das bactérias. Ou seja, os antimicrobianos podem ocorrer na interferência da replicação cromossómica - a maquinaria celular envolvida na replicação do DNA ou transcrição e tradução do RNA mensageiro, fica afetada tendo um efeito inibitório no seu crescimento. Assim, as bactérias foram obrigadas a adotar mecanismos de defesa intrínsecos, como a expressão de genes que codificam informação para a síntese de enzimas inativadoras, e extrínsecos, como a incorporação de porções de DNA extracelulares que contêm a informação necessária para que a bactéria, não desenvolva mecanismos eficazes contra a ação de determinados antibióticos, como disponha dos elementos necessários para que dissemine esta capacidade, à própria, por forma a tornarem-se resistentes ao efeito dos antibióticos (Klous, Huss, Heederik, & Coutinho, 2016; Ochman, Lawrence, & Groisman, 2000).

A produção intensiva de frangos de aviário apresenta grande importância económica na indústria avícola e o facto de existirem bactérias muito incidentes em aves, que comprometem as explorações levando a uma enorme mortalidade das aves, faz com que seja do interesse das explorações avícolas que a partir dos extratos das plantas se venha a proporcionar um efeito positivo entre a relação bem-estar e produção de aves em escala industrial. Assim, o uso de probióticos, devido às suas atividades biológicas, nomeadamente atividades antioxidantes e antimicrobianas, que atuam contra bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella enterica*, alia-se ao facto de não existirem perdas na produção animal, diante de um mercado de consumidores cada vez mais exigente quanto à forma de criação dos animais e qualidade dos produtos.

O uso abusivo de antibióticos na alimentação do gado com o intuito de promover o seu crescimento e reduzir o índice de mortalidade causada por patologias ter vindo a ser relacionada com a transmissão e proliferação de bactérias resistentes fez com que a União Europeia limitasse o uso de AGPs na indústria agropecuária (Brenes & Roura, 2010).

Desde então que, os fitobióticos, que compreendem uma gama alargada e variada de substâncias químicas cujos compostos ativos são classificados como metabolitos secundários, têm vindo a

despertar interesse por parte da comunidade científica devido às suas atividades biológicas, nomeadamente, atividade antibacteriana e antioxidante, podendo atuar no trato gastro-intestinal dos animais. Os óleos essenciais de plantas bem como outros tipos de extratos têm vindo a ser aplicados nas mais variadas áreas, nomeadamente, na indústria alimentar como conservantes naturais, existindo já um conjunto de produtos reconhecidos como seguros (DMC Base Natural, Protecta One e Protecta Two). Já são vários os estudos que comprovam efetivamente a atividade antimicrobiana de extratos de plantas contra bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp (Burt, 2004; Cosentino et al., 1999; Lopes-lutz, Alviano, Alviano, & Kolodziejczyk, 2008; Ultee, Bennik, & Moezelaar, 2002).

A bactéria *Staphylococcus aureus* é uma Gram-positiva, pertencente à flora normal da pele, está presente na cavidade nasal, sendo facilmente transmitida aos alimentos pelas mãos dos manipuladores. A pododermatite, também chamada de dermatite da pata, de contacto ou bumblefoot, é uma infeção que ocorre nos membros inferiores das aves, causada pelo agente etiológico *Staphylococcus*, sendo a espécie mais comum a *S. aureus*. O excesso de humidade e a falta de higiene dos aviários são algumas das condições favoráveis ao crescimento da bactéria, que causa a doença. Fatores nutricionais como a fonte de grãos, a suplementação com vitaminas, minerais e aminoácidos, o nível de proteína e a densidade da doença, bem como fatores relacionados ao sexo, tamanho corporal e raça, também têm sido associados à pododermatite como fatores predisponentes. Todos os tipos de lesões provocadas criam um edema no local, podendo apresentar-se de várias formas, tais como hiperkeratose, formação de abcesso com ou sem canal fistuloso, levando à fragilização dos tecidos adjacentes. Estas lesões podem evoluir para necrose dos pés e uma infeção generalizada, levando à morte das aves. A apatia, perda de apetite e o facto de as aves não conseguirem apoiar o pé no chão devido às dores sentidas, são alguns dos sintomas (Fitzgerald, 2012; Olsen, Christensen, Kabell, & Bisgaard, 2018; Poulsen et al., 2017).

A *E. coli* é um bacilo Gram (-), pertencente à família *Enterobacteriaceae*. É habitante normal do trato gastrointestinal do Homem e animais. A colibacilose em aves é uma doença comum na avicultura que está relacionada com infeção sistémica ou localizada, provocada pela *E. coli* patogénica (Avian Pathogenic *Escherichia coli* - APEC), que causa septicémia, doença respiratória crónica, osteomielite, entre outras. A *E. coli*, encontra-se no intestino das aves e é eliminada através das fezes, encontrada em ambientes sem higiene sanitária. É uma doença que para além de causar infeções e lesões nas vísceras, atinge o sistema respiratório das aves, apresentando alguns sintomas como, diminuição do apetite, baixo desenvolvimento no crescimento, entre outros, podendo ainda apresentar quadros de artrite. A colibacilose tem vindo a ser controlada através de medidas profiláticas e o uso de

antibacterianos. Contudo, o uso excessivo dos antibacterianos, como promotores de crescimento, tem gerado inúmeras preocupações devido ao crescente número de bactérias resistentes bem como a indesejada presença de resíduos medicamentosos em carnes, leite e ovos (Saidenberg & Knobl, 2005; Santurio et al., 2011).

A *Salmonella* spp, é uma bactéria Gram (-), com a forma de bacilo, encontrada em animais, incluindo o Homem (reservatório). Nas aves, a *Salmonella* está normalmente presente no trato intestinal, sendo que os serotipos que causam a salmonelose em humanos não mostram sintomas evidentes de infecções nestes animais. A pulorose e o tifo aviário são doenças que ocorrem nas aves provocadas pelo agente etiológico *Salmonella Pullorum* e *Salmonella Gallinarum*, respetivamente. A pulorose é uma doença que pode ocorrer em todas as fases de crescimento, contudo as aves são mais suscetíveis no início de vida, causando altas taxa de mortalidade. Nas aves jovens a doença apresenta-se na forma aguda e septicémica, causando asas caídas, dificuldade respiratória, presença de material branco na cloaca, consequência da diarreia branca, entre outros sintomas. Enquanto que, nas aves em crescimento e adultas, a doença se apresenta na forma crónica, não sendo os sintomas sempre evidentes, mas pode existir entre outros sintomas, diminuição da fertilidade, diarreia branco-amarelada e amarelo-esverdeada. As aves que sobrevivem a esta doença podem-se tornar portadoras e transmitir a doença através dos ovos contaminados. O tifo aviário é uma doença que afeta as aves em qualquer idade, apresentando-se na forma aguda e septicémica, contudo a doença também pode ser encontrada na sua forma crónica atingindo aves em crescimento e adultas. O período de incubação varia de 4 a 7 dias, o desenvolvimento da doença é rápido, podendo levar à morte 48 horas após o aparecimento dos sintomas. Nas aves adultas, onde a doença se manifesta com mais frequência, as aves não se alimentam, surge diarreia amarela e esverdeada, entre outros sintomas. Quando atinge as aves jovens, os sintomas desta doença podem ser confundidos com a pulorose (Prazeres, 2004; Shivaprasad, 2000).

## 1.6. Objetivos

O trabalho que se apresenta teve como principal objetivo contribuir para a valorização dos subprodutos de Tomilho Bela-luz (*Thymus mastichina*) e Orégãos (*Origanum vulgare*).

Os extratos obtidos das macerações aquosa, hidroetanólica e etanólica, foram estudados quanto à sua composição em carboidratos, bem como a quantificação dos compostos fenólicos totais em equivalentes de ácido gálico (EAG) e atividade antioxidante.

O estudo incluiu ainda a identificação e quantificação dos constituintes dos óleos essenciais obtidos por dois tipos de hidrodestilação, convencional e assistida por micro-ondas. Na hidrodestilação convencional, os caules estão submersos em água e o aquecimento foi feito por convecção, e na hidrodestilação assistida por micro-ondas, os caules foram reidratados e escorridos e o aquecimento foi feito por radiação do micro-ondas. Os óleos essenciais foram testados contra a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella enterica*, de modo a relacionar a composição em compostos terpênicos com a atividade antimicrobiana.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Amostras de subprodutos

As amostras de caules de Tomilho Bela-luz, colhidas em anos diferentes, 2016 e 2017, e Orégãos, colhidos em 2017, foram adquiridas na empresa portuguesa Ervital - Plantas Aromáticas e Medicinais, Lda. que tem como objetivo principal a produção e comercialização de plantas aromáticas medicinais em modo de produção biológico, usadas na preparação de infusões e como condimentos na alimentação. As plantas foram cultivadas em Mézio, Castro D'Aire, e obtidas em condições ecológicas e ambientais muito características, os campos de produção situam-se a cerca de 1000 metros de altitude, envolvidos por vegetação autóctone e sem áreas de cultivo nas zonas envolventes, as plantas cresceram sem irrigação. Os subprodutos, essencialmente caules, resultam da separação das folhas após secagem da planta (Ervital, 2018). Estes subprodutos correspondem a cerca de 40% da produção.



*Figura 6 - Amostra dos subprodutos de Tomilho Bela-luz*

### 2.2. Reagentes

Ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ), boro-hidreto de sódio ( $NaBH_4$ ) e diclorometano foram adquiridos da Fischer Chemicals. 2-desoxiglucose, 1-metilimidazol, 3-fenilfenol, ABTS (ácido 2,2'-azinobis-[3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico]), Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico), amoníaco ( $NH_3$ ), ácido galacturónico e reagente de Folin-Ciocalteu foram comercialmente obtidos da Sigma-Aldrich. Ácido acético glacial e anidrido acético, foram obtidos da VWR Chemicals Prolabo. Ácido gálico, carbonato de sódio e sulfato de sódio de anidro foram obtidos da Panreac. 2-undecanol e persulfato de potássio ( $K_2S_2O_8$ ) foram adquiridos da Fluka. Ácido bórico 200 mM, hidróxido de sódio ( $NaOH$ ) e etanol foram comercialmente obtidos pelas empresas May and Baker Laboratory Chemicals, LABCHEM e Carlo Erba, respetivamente. Meio Mueller-Hinton (MH),



antibióticos (ciprofloxacina e gentamicina) e discos brancos foram adquiridos da Oxoid, Meio Luria Bertuni (LB) e Agar foram comercialmente obtidos da NZYtech e Merck, respectivamente.

### 2.3. Extração de compostos solúveis em água e etanol

O material seco de Tomilho Bela-luz (*Thymus mastichina*) e Orégãos (*Origanum vulgare*), aproximadamente, 40 g de caules, foram moídos em moinho de crivo. Seguidamente, foram feitas 3 macerações com 100 mL de solvente para cada planta: H<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>O:EtOH (50:50) e EtOH, com 2 réplicas por extração. Após a maceração, os extratos foram centrifugados durante 10 minutos, a 5000 rpm, a uma temperatura de 4°C. O sobrenadante foi recolhido e evaporado num evaporador rotativo (Rotavapor R-210), com uma pressão de 80 mBar, a uma temperatura de 40°C. Por fim, procedeu-se à liofilização dos extratos, os extratos secos foram pesados, de forma a determinar o rendimento de extração.

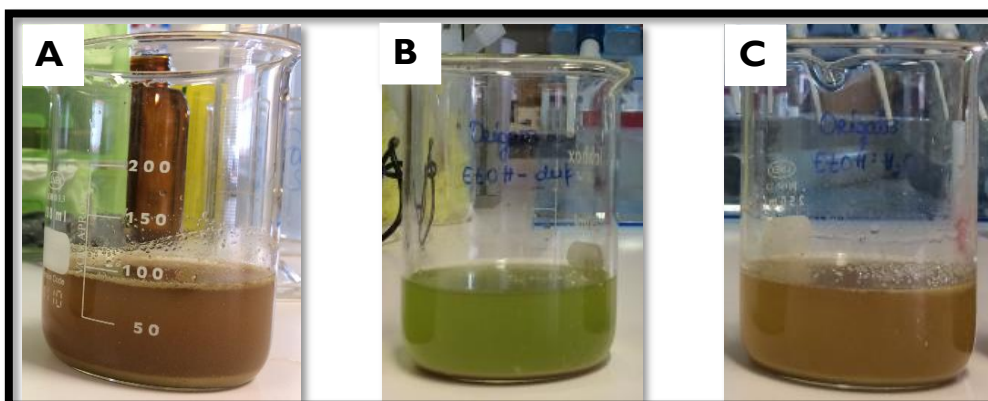


Figura 7 - Extração dos compostos solúveis em diferentes solventes, água (A), etanol (B) e etanol:água (50:50) (C)

#### 2.3.1. Compostos Fenólicos Totais

A determinação dos compostos fenólicos totais foi realizada através do método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu utilizando como solução padrão o ácido gálico. O método de Folin-Ciocalteu ou método dos fenóis totais, baseia-se na quantificação da atividade antioxidante através da quantificação dos compostos fenólicos presentes na amostra a testar. É um método baseado na mistura dos ácidos fosfotúngstico e fosfomolibdico que, em meio alcalino, reagem com os compostos fenólicos presentes na solução, ocorrendo dissociação de um protão fenólico levando à formação do anião fenolato. Este anião tem a capacidade de reduzir o reagente de Folin, formando assim o complexo azul de molibdénio, com uma intensa absorção perto de 760 nm. A intensidade da cor da

solução é proporcional à concentração de compostos fenólicos totais. A metodologia para a execução deste ensaio foi adaptada de Ferreira et al. (2002), com algumas modificações (Ferreira et al., 2002). Foi preparada uma solução padrão de ácido gálico (100 mg/L). Prepararam-se 3 tubos com cada um dos seguintes padrões 0, 16, 31, 63, 94, 125  $\mu$ L aos quais se juntou água destilada até perfazer um volume de 125  $\mu$ L. Foram pesados, aproximadamente, 1 mg de cada extrato para 10 mL de água destilada. Uma alíquota de 0,125 mL de amostra foi transferida para um tubo, Adicionou-se a cada um dos tubos (os 3 tubos de cada extrato e os 18 dos padrões) 0,5 mL de água destilada e 0,125 mL de reagente de Folin. Homogeneizou-se a solução no vórtex e deixou-se a reagir no escuro durante 5 minutos, à temperatura ambiente. Adicionou-se 1,250 mL de solução de carbonato de sódio,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (75 g/L) e 1 mL de água destilada. Homogeneizou-se a solução no vórtex e deixou-se a reagir no escuro durante 90 minutos, à temperatura ambiente. A quantidade de compostos fenólicos totais foi expressa em microgramas equivalentes de ácido gálico por miligrama de extrato seco.

### 2.3.2. Análise de carboidratos

Para análise dos polissacarídeos foram analisados os açúcares totais e os açúcares livres.

#### 2.3.2.1. Açúcares totais

Foram pesados, aproximadamente, 2 mg de amostra em duplicado para um tubo de cultura, e começou-se por fazer hidrólise, adicionando-se 200  $\mu$ L de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 72% (m/m) e deixou-se a incubar à temperatura ambiente durante 3 horas, com agitação ocasional. Seguidamente, foram adicionados 2,2 mL de água destilada, perfazendo uma concentração final de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 M, procedendo-se à hidrólise a 100°C num bloco de aquecimento durante 2 horas e 30 minutos. No final da primeira hora retirou-se uma alíquota de 0,5 mL para a análise de ácidos urónicos (2.3.2.4.). Arrefeceram-se os tubos num banho de gelo. Seguidamente as amostras foram reduzidas e acetiladas; adicionaram-se 200  $\mu$ L de padrão-interno 2-desoxiglucose (1 mg/mL) a cada tubo, transferiu-se 1 mL de amostra para novos tubos de cultura e neutralizou-se com 200  $\mu$ L de amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) a 25%; tendo-se confirmado o pH e procedeu-se a ajustes (em caso necessário). A amostra foi reduzida com 100  $\mu$ L de boro-hidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ) (150 mg de  $\text{NaBH}_4$  por 1 mL de  $\text{NH}_3$  3 M, esta solução tem que ser preparada imediatamente antes da adição) e colocou-se num bloco de aquecimento a 30°C durante 1 hora. Arrefeceu-se os tubos num banho de gelo e adicionou-se 2 x 50  $\mu$ L de ácido acético glacial, com o objetivo de eliminar o excesso de  $\text{BH}_4^-$ . Transferiu-se 300  $\mu$ L para tubos SOVIREL,

colocaram-se os tubos num banho de gelo e foram adicionados 450  $\mu$ L de 1-metilimidazol e 3 mL de anidrido acético, os quais foram muito bem agitados e colocados num bloco de aquecimento a 30°C durante 30 minutos. Novamente num banho de gelo, adicionou-se 3 mL de água destilada, com o objetivo de decompor o excesso de anidrido acético, e 2,5 mL de diclorometano, agitaram-se muito bem manualmente os tubos, com o objetivo de extrair os acetatos de alditol, e foram centrifugados durante 30 segundos a 3000 rpm, para a separação das duas fases, e aspirou-se a fase aquosa por sucção; este passo foi repetido mais uma vez. De seguida, lavou-se bem a fase orgânica com 3 mL de água destilada, agitou-se, centrifugou-se e removeu-se totalmente a fase aquosa; a lavagem foi repetida mais uma vez. Transferiu-se a fase orgânica para tubos adequados para a *speedvac* e evaporou-se o diclorometano. Adicionou-se 1 mL de acetona anidra e evaporou-se; repetiu-se este passo mais uma vez (Coelho, Rocha, Moreira, Domingues, & Coimbra, 2016).

#### 2.3.2.2. Açúcares livres

À semelhança da análise dos açúcares totais, a metodologia e os materiais para a análise dos açúcares livres são os mesmos, à exceção de que para esta análise as amostras não são hidrolisadas.

#### 2.3.2.3. Análise dos acetatos de alditol no GC-FID

A identificação e quantificação dos acetatos de alditol obtidos após hidrólise dos polissacarídeos e derivatização dos respectivos monossacarídeos, presentes nas amostras de Tomilho Bela-luz e Orégãos foram realizadas através da análise de cromatografia em fase gasosa com detetor de ionização de chama (GC-FID). Os acetatos de alditol foram dissolvidos em 50  $\mu$ L de acetona anidra, e injetou-se 1  $\mu$ L no GC-FID em modo *split*. As amostras foram analisadas num cromatógrafo (Perkin Elmer – Clarus 400). A coluna usada foi uma DB-225, com a temperatura do injetor a 220°C, de 0,25 mm de diâmetro, 30 m de comprimento e 0,15  $\mu$ m de espessura. O forno foi programado para uma temperatura inicial de 200°C, seguido de um aumento de 40°C/min até 220°C, permanecendo a esta temperatura durante 7 min, seguido de um aumento da temperatura até 230°C (20°C/min). A identificação dos analitos foi feita recorrendo a co-injeção de padrões.

#### 2.3.2.4. Ácidos urónicos

Os ácidos urónicos foram quantificados pelo método colorimétrico do *m*-fenilfenol usando uma curva

de calibração de ácido galacturónico. Para a construção da reta de calibração, foi preparada uma solução padrão de ácido galacturónico com uma concentração de 200 µg/mL, de onde se retirou 0, 50, 100, 150, 200 µL num volume total de 500 µL. Para cada padrão preparam-se 3 tubos (1 branco e 2 réplicas). O hidrolisado (0,5 mL) foi diluído com 3 mL de água destilada. Prepararam-se 3 tubos para cada amostra (1 branco e 2 réplicas) com 0,5 mL de amostra. Colocaram-se os tubos das amostras e dos padrões num banho de gelo e adicionou-se a cada um deles 3 mL de borato de sódio 50 mM preparado em ácido sulfúrico concentrado. Agitaram-se, manualmente, todos os tubos e colocaram-se num banho a 100°C durante 10 minutos e, novamente, arrefeceram-se os tubos num banho de gelo. O controlo foi efetuado na presença de todos os reagentes e amostra, à exceção do *m*-fenilfenol, MFF (MFF 0,15% (m/v) em 0,5% (m/v) NaOH) em 1 (branco) dos 3 tubos. Os tubos foram agitados manualmente e deixaram-se a reagir no escuro, à temperatura ambiente, durante 30 minutos. Ao fim deste tempo, voltaram a agitar-se os tubos para homogeneizar a solução e leu-se a absorvância a 520 nm.

#### 2.4.Extração dos óleos essenciais

Para obtenção dos hidrodestilados foram utilizados dois métodos de extração: hidrodestilação convencional e hidrodestilação assistida por micro-ondas. A hidrodestilação convencional refere-se à separação de componentes de uma mistura devido à diferença da pressão de vapor. Toda a substância com determinado ponto de ebulição é volátil e possui um determinado valor de pressão de vapor, que por sua vez é dependente da temperatura. Logo, os constituintes do óleo essencial dos extratos da planta, em contacto com a água aquecida, receberão pressão das moléculas de vapor de água entrando em ebulição. Já no estado volátil, estes constituintes são condensados e separados da água. A hidrodestilação convencional é um método antigo e versátil no qual o material vegetal está em contacto direto com a água em ebulição. O vapor de água força a abertura das paredes celulares e ocorre a evaporação do óleo que está entre as células dos extratos da planta. O vapor, que consiste na mistura do óleo e da água, passa por um condensador, onde ocorre o seu arrefecimento (Ruiz, 2015). A hidrodestilação assistida por micro-ondas, é uma tecnologia rápida e que traz uma série de vantagens na extração do óleo essencial, devido ao reduzido tamanho do equipamento, à facilidade de uso, à velocidade de extração e à capacidade de controlo no processo através da programação do equipamento. Contribuindo assim para que, o maior objetivo deste tipo de extração seja aumentar os rendimentos das extrações e reduzir o tempo de extração, reduzindo, conseqüentemente, os custos, bem como a energia e assim reduzir o impacto ambiental. Ao contrário da hidrodestilação

convencional, este tipo de extração utiliza a água interna da amostra ou água de hidratação para arrastar os compostos voláteis, logo a humidade do material vegetal tem que ser sempre superior a 50%, de modo a possuir água suficiente que permita o arraste do óleo essencial. Neste caso, a célula da planta é estimulada quando está sob radiação do micro-ondas, de modo que a mudança interna é imediata, e resulta num aumento da pressão e temperatura dentro da célula da planta, o que leva à quebra das paredes celulares e à libertação das moléculas alvo. Este método envolve a colocação de material vegetal fresco ou reidratado num micro-ondas sem qualquer adição de solvente ou água. O aquecimento interno da célula da planta distende as paredes celulares e leva à rutura destas. Assim, este processo liberta o óleo essencial contendo os compostos bioativos, que são arrastados pela água. Um sistema de arrefecimento fora do micro-ondas permite a condensação contínua do destilado, que é composto por água e óleo essencial (Périno-issartier, Ginies, Cravotto, & Chemat, 2013; Vian, Fernandez, Visinoni, & Chemat, 2008).

#### 2.4.1. Hidrodestilação convencional

Foram pesados em triplicado, aproximadamente, 100 g de caules de Tomilho Bela-luz e Orégãos para a realização das hidrodestilações aquosas. Seguidamente, os caules dos subprodutos foram colocados num balão de fundo redondo (com capacidade de 2000 mL) com 1000 mL de água destilada (figura 8). O processo foi parado quando se obteve um volume de hidrodestilado de 250 mL.



Figura 8 – Obtenção dos hidrodestilados por hidrodestilação convencional

#### 2.4.2. Hidrodestilação assistida por micro-ondas

Para a hidrodestilação assistida por micro-ondas foram pesados em triplicado, aproximadamente, 100 g de caules de Tomilho Bela-luz e Orégãos, sendo posteriormente hidratados durante a noite (atingindo em média, 69% de humidade). Seguidamente, utilizou-se o NEOS – GR Millestone (figura 9), com uma potência de 500 W. O processo foi parado quando se obteve um volume de hidrodestilado, aproximadamente, 180 mL e cerca de 15% de humidade no subproduto, com o objetivo de se evitar o *burning point*.



Figura 9 - Obtenção dos hidrodestilados por hidrodestilação assistida por micro-ondas

#### 2.5. Extração líquido-líquido dos hidrodestilados com solventes orgânicos

O método de extração com solventes orgânicos consiste em colocar um solvente orgânico em contacto com o hidrodestilado obtido a partir da hidrodestilação convencional ou hidrodestilação assistida por micro-ondas. Neste método, utiliza-se um funil de separação, onde o hidrodestilado e o solvente escolhido são adicionados. Com a agitação do funil de separação e após um intervalo de tempo suficiente, o soluto passa à fase na qual está o solvente com maior afinidade. A separação é feita sendo que a fase mais densa é recolhida primeiro. A extração líquido-líquido é indicada quando existe uma grande diferença de solubilidade nos dois solventes. Os óleos essenciais são extraídos, preferencialmente, com solventes apolares como, por exemplo, o diclorometano. O óleo é obtido pela secagem em corrente de azoto do solvente presente na fase líquida. Relativamente aos hidrodestilados resultante das extrações obtidas por hidrodestilação convencional e hidrodestilação assistida por micro-ondas, estes foram colocados numa ampola de decantação (com capacidade de 500 mL),

juntamente com 30 mL de diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). Como referido anteriormente, também foi feita extração líquido-líquido com o solvente orgânico *n*-hexano ( $\text{C}_6\text{H}_{14}$ ) para o hidrodestilado obtido por hidrodestilação convencional dos caules de Tomilho bela-luz; para este tipo de extração, o processo assim como, as quantidades, foram exatamente as mesmas. Passou-se a fase orgânica de todos os extratos por sulfato de sódio de anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), para remover a água que ainda pudesse existir nesta fase. A fase orgânica foi submetida à evaporação do diclorometano e do *n*-hexano em corrente de azoto, até obtenção do óleo essencial.

## 2.6. Análise dos óleos essenciais por GC-MS

A identificação e quantificação dos compostos presentes nos óleos essenciais foram realizadas através da análise de cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS). Devido à natureza volátil a técnica de cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa é a mais adequada para analisar os monoterpenóides e os sesquiterpenóides. A associação de um espectrómetro de massa a um cromatógrafo em fase gasosa permite identificar cada componente pelo seu espectro de fragmentação. Os espectros de fragmentação podem ser comparados com uma biblioteca com centenas de espectros de massa o que faz com que a identificação dos componentes do óleo essencial esteja mais facilitada. Para análise dos compostos do óleo essencial pesou-se 1 mg de óleo de cada extrato, os quais foram dissolvidos em padrão interno 2-undecanol, com uma concentração de 1,652 g/L, e 40  $\mu\text{L}$  de diclorometano. Foram injetados 1  $\mu\text{L}$  no GC-MS em modo *pulsed splitless*. As amostras foram analisadas num cromatógrafo (Agilent Technologies 6890N, modelo 6890 Network GCSystem/5973Network Mass selectiv Detector) com detetor MS. A coluna usada foi uma DB-FFAP, com a temperatura do injetor a 250°C, de 0,32 mm de diâmetro interno, 30 m de comprimento e 0,25  $\mu\text{m}$  de espessura de filme líquido. O forno foi programado para uma temperatura inicial de 40°C até 72°C (1°C/min), seguindo de um aumento de temperatura até 130°C (2°C/min), tendo depois um aumento de temperatura até 220°C (7°C/min). O gás de arraste utilizado foi o Hélio com a pressão da coluna a 14 PS. A temperatura da fonte foi de 255°C e o espectrómetro de massa trabalhou em modo de impacto a 70 eV, a análise foi feita em modo *full scan* no intervalo de 33-300  $m/z$  a 5,24 ciclos/s. A identificação dos compostos foi realizada por comparação dos espectros de massa dos compostos com os espectros de massa da base de dados Wiley 275 e espectros de massa da literatura (NIST) (NIST, 2018). Foram, ainda, calculados os índices de retenção (RI) para cada composto identificado e os seus valores foram comparados com os valores reportados na bibliografia para o mesmo tipo de coluna. De forma a calcular os índices de retenção utilizou-se uma

série de alcanos C<sub>8</sub> a C<sub>20</sub>. Posteriormente, os índices de retenção foram calculados com base na seguinte fórmula:

$$RI = \left[ \frac{(TR_{\text{pico}} - TR_{\text{ant}})}{(TR_{\text{posterior}} - TR_{\text{ant}})} + C_{n_{\text{ant}}} \right] \times 100$$

Onde, RI é o índice de retenção, TR<sub>pico</sub> é o tempo de retenção do pico de interesse, TR<sub>ant</sub> é o tempo de retenção do alcano anterior, TR<sub>posterior</sub> é o tempo de retenção do alcano posterior e C<sub>n<sub>ant</sub></sub> é o número de carbonos do alcano anterior.

## 2.7. Atividades biológicas

### 2.7.1. Atividade antioxidante dos extratos aquoso, hidroetanólico e etanólico

A atividade antioxidante foi medida pela inibição do radical ABTS<sup>•+</sup> pelos extratos aquosos, hidroalcoólicos e etanólicos, obtidos a partir dos 3 subprodutos em estudo. O radical ABTS<sup>•+</sup> é originado pela oxidação do ABTS com persulfato de potássio (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>). O método de análise ABTS<sup>•+</sup> é aceite e muito utilizado para a quantificação da atividade antioxidante de muitos fitoquímicos, sendo um dos testes mais rápidos e que oferece resultados reprodutíveis, além de oferecer máximos de absorção e uma boa solubilidade, permitindo análises de compostos tanto de natureza lipofílica como hidrofílica. É um composto cromóforo (apresenta uma cor verde escura), que sofre diminuição de intensidade de acordo com a presença de espécies antioxidantes, apresenta alta solubilidade em água e absorvância a 734 nm (Wojdylo, Oszmianski, & Czemerys, 2007). Neste estudo, para avaliação da atividade antioxidante os extratos foram reagidos com o radical ABTS. Previamente (24 horas antes) foi preparada uma solução com persulfato de potássio (3 mg em 5 mL de água destilada) à qual foi adicionada uma massa de 19 mg de ABTS para formação do radical e deixou-se a solução a reagir no escuro. O controlo foi efetuado na presença de todos os reagentes e na ausência de extrato. Para a construção da reta de calibração, foi preparada uma solução padrão de Trolox com uma concentração de 1 mg para 10 mL de água destilada, de onde se retirou 0, 10, 20 30, 40, 50 µL perfazendo um volume total de 50 µL com água destilada. Pesou-se num tubo de cultura, 1 mg de extrato para 20 mL de água destilada. Diluiu-se 1 mL da solução ABTS<sup>•+</sup>, que foi preparada anteriormente, em 80 mL de água destilada. A mistura da reação foi constituída por 50 µL de amostra e 1 mL da solução ABTS diluída em 80 mL de água destilada. Aos padrões também foi adicionado 1 mL da solução ABTS diluída em 80 mL de água destilada. Homogeneizaram-se todos os tubos no vórtex e ficou a



reagir no escuro durante 15 minutos, à temperatura ambiente. Leu-se a absorvância a 734 nm. Os resultados foram expressos em TEAC, capacidade antioxidante equivalente ao Trolox, em mM.

## 2.7.2. Atividade antimicrobiana

### 2.7.2.1. Microrganismos

Foi avaliado o efeito antimicrobiano dos óleos essenciais em bactérias Gram (+) e Gram (-), uma vez que o efeito antimicrobiano dos óleos está relacionado, principalmente, com a alteração da permeabilidade e integridade da membrana celular bacteriana. Para este estudo as bactérias escolhidas foram uma Gram (+), *Staphylococcus aureus* e duas Gram (-), *Salmonella enterica* e *Escherichia coli*. Outro dos fatores que se teve em conta na escolha das bactérias foi o facto de estas serem as principais responsáveis por infeções em aves. Para este trabalho foi usada uma *Salmonella enterica* sv Anatum SF2, isolada de fezes de gaivota, estando denominada ao longo deste trabalho como *Salmonella enterica* F2, e a *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 e *Escherichia coli* ATCC 6538.

### 2.7.2.2. Meios de cultura: Luria Bertuni, Luria Bertuni com Agar e Mueller Hinton

Todos os meios usados neste trabalho, o meio Luria Bertuni (LB), o meio Luria Bertuni com Agar (LB com Agar) e o meio Mueller Hinton (MH), foram preparados de acordo com as instruções do fabricante, 25 g de meio desidratado para 1 L de água destilada, meio LB mais 20 g de Agar para 1 L de água destilada e 38 g de meio desidratado para 1 L de água destilada, respetivamente, sendo esterilizados logo de seguida por autoclavagem. Após a esterilização, o meio LB e LA foram guardados à temperatura ambiente e o meio MH foi armazenado na estufa a 50°C.

### 2.7.2.3. Preparação dos meios de cultura e inoculação das placas

Todas as estirpes estavam crio-preservadas em glicerol a -80°C. Para a reativação celular inocularam-se 20 µL de glicerol de cada estirpe em 5 mL de LB. Seguidamente, as culturas foram incubadas à temperatura ótima de crescimento (37°C) com agitação, 180 rpm. Após 24 horas foi feito um riscado por exaustão para confirmar a pureza das estirpes, em placas com meio LA, com inoculação de LB com glicerol. Novamente, as placas foram postas a incubar à temperatura ótima de crescimento (37°C) durante 24 horas. A partir destas placas retirou-se uma colónia de cada estirpe e colocaram-se em *eppendorfs* com 1 mL de soro e realizaram-se suspensões de 0,5, 1 e 2 Macfarland, com o objetivo

de padronizar o inóculo e avaliar o crescimento das culturas bacterianas. Seguidamente, inocularam-se placas com meio MH e, a partir dos *ependorfs* com soro, fez-se o espalhamento nestas mesmas placas para cada bactéria. Colocaram-se discos brancos, para cada amostra a testar e um para a água destilada, usado como controlo negativo, e dois discos com antibiótico, ciprofloxacina e gentamicina, sendo os controlos positivos. Foram colocados na estufa a 37°C, temperatura ótima de crescimento das bactérias em estudo, e, ao fim de 24 horas, foram medidos os halos de inibição.

## 2.8. Análise estatística

As representações gráficas dos dados médios foram construídas com o Microsoft Excel 2017, com as barras de erro representando os desvios-padrão. A análise estatística foi realizada utilizando a análise de variância unidirecional (ANOVA) com o teste de comparação múltipla de Tukey para determinar diferenças significativas entre os grupos, considerando o valor de *p-value* <0,05. Os dados de resultados que foram rotulados com letras diferentes exibem diferenças estatísticas.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Extração dos compostos solúveis em soluções aquosas e etanólicas

Os subprodutos de Tomilho Bela-Luz e de Orégãos foram sujeitos a uma maceração com diferentes solventes, para a extração dos compostos solúveis em água, água:etanol (50:50) e etanol. O rendimento, apresentado em % (m/m), para o método de extração usando diferentes solventes foi definido como a quantidade de extrato recuperado em massa por 100 g de material vegetal das amostras.

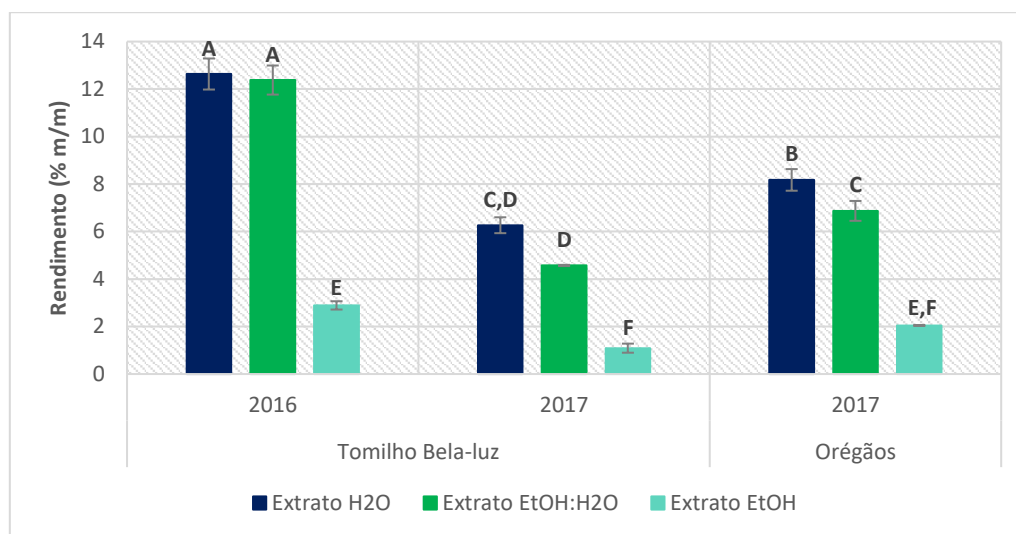


Figura 10 - Rendimento das extrações aquosas, hidroetanólicas e etanólicas do Tomilho Bela-luz 2016 e 2017 e Orégãos. Os resultados apresentados são a média  $\pm$  desvio-padrão de ensaios independentes. Médias que não compartilham a mesma letra são estatisticamente significativas,  $p \leq 0,05$ .

O Tomilho Bela-luz 2016 foi a amostra com melhores rendimentos. As macerações com água e com etanol:água (50:50) tiveram um rendimento de  $13 \pm 0,8\%$  e  $12 \pm 0,8\%$ , respetivamente, rendimentos estes que foram significativamente superiores às outras macerações. Nos Orégãos, e à semelhança do que aconteceu com os Tomilho Bela-luz 2016 e 2017, a maceração aquosa foi a que mostrou maior rendimento,  $8 \pm 0,6\%$ , seguida da maceração hidroetanólica ( $7 \pm 0,5\%$ ) e com um rendimento muito inferior a maceração etanólica ( $3 \pm 0,2\%$ ). Comparativamente com o Tomilho Bela-luz 2016, o de 2017 teve rendimentos muito inferiores. No entanto, com a mesma tendência, a maceração aquosa foi a que teve um maior rendimento,  $6 \pm 0,4\%$ , seguida da extração hidroetanólica com um rendimento de  $5 \pm 0,0\%$ . No Tomilho Bela-luz 2016, a extração etanólica obteve um rendimento de  $3 \pm 0,2\%$ , revelando ser significativamente superior ao rendimento da extração etanólica no Tomilho Bela-luz 2017, que obteve um rendimento de  $1 \pm 0,2\%$ . Por fim, o mesmo solvente de extração obteve um rendimento de  $2 \pm 0,0\%$  nos Orégãos, não revelando diferenças significativas comparativamente às

amostras de Tomilho. Neste caso, podemos concluir que se verificam mais diferenças no rendimento de extração de compostos solubilizados em água, água:etanol (50:50) e etanol a nível da mesma espécie de anos diferentes, do que em termos de espécies diferentes do mesmo ano. Tais diferenças podem ser explicadas pelas condições edafoclimáticas em cada ano.

A escolha da água como solvente resultou no aumento da eficiência da extração das macerações nas amostras não só entre amostras de plantas diferentes, Tomilho Bela-luz e Orégãos, mas também, entre amostras da mesma planta de anos diferentes, nomeadamente Tomilho Bela-luz 2016 e 2017.

Para todos os extratos dos diferentes subprodutos, verificou-se o mesmo comportamento relativamente ao solvente de extração, tendo sido as extrações aquosas e hidroetanólica as que obtiveram um maior rendimento do material vegetal. Não há estudos sobre o rendimento de extração de compostos solúveis em água e etanol de subprodutos, no entanto, podemos comparar os rendimentos das extrações obtidos neste estudo com rendimentos obtidos de extratos das partes aéreas de *Thymus mastichina* e *Origanum vulgare* (Albano & Miguel, 2011). Se compararmos os rendimentos das extrações dos subprodutos e das partes aéreas com etanol, os rendimentos são muito similares. O rendimento das extrações dos compostos solúveis dos subprodutos com etanol:água (50:50) revelaram ser 10 e 7 vezes superior para o *Thymus mastichina* e *Origanum vulgare*, respetivamente, em relação à extração hidroetanólica das partes aéreas com 70% de etanol e 30% de água, mostrando que os compostos do Tomilho Bela-luz e Orégãos são mais solúveis em soluções hidroetanólicas com maior percentagem de água ou mesmo usando água como solvente de extração.

### 3.1.1. Quantificação do teor de compostos fenólicos

Os extratos obtidos das macerações foram avaliados em equivalentes de ácido gálico (EAG) o teor em compostos fenólicos totais, quer em quantidade por mg de extrato, quer por g de caules (figura 11).

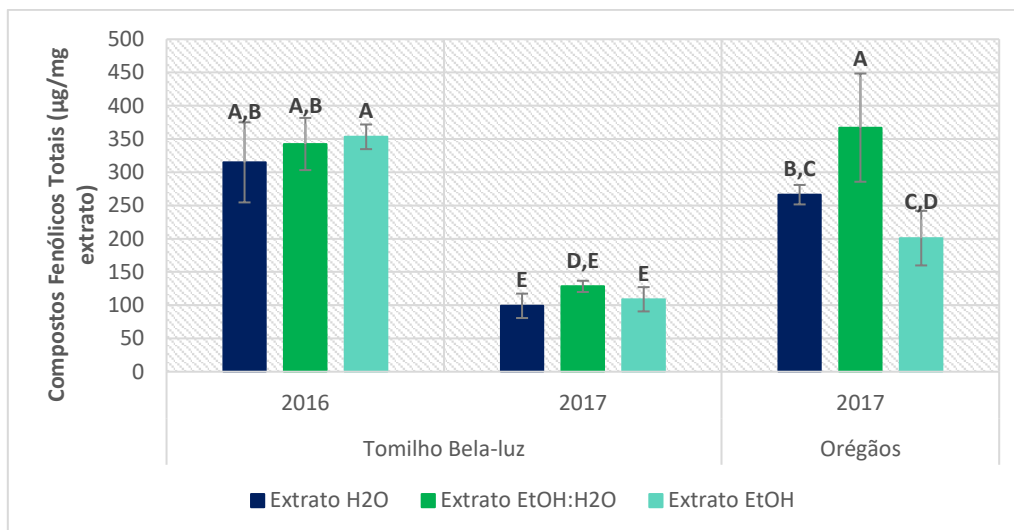


Figura 11 – Quantidade total de compostos fenólicos totais ( $\mu\text{g EAG/mg extrato}$ ) para as diferentes espécies de subprodutos. Os resultados apresentados são a média  $\pm$  desvio-padrão de ensaios independentes. Médias que não compartilham a mesma letra são estatisticamente significativas,  $p \leq 0,05$ .

Os resultados obtidos para o Tomilho Bela-luz 2016 apresentaram um teor de compostos fenólicos totais similares entre os extratos,  $353 \pm 11,3 \mu\text{g EAG/mg}$  para o extrato etanólico,  $342 \pm 38 \mu\text{g EAG/mg}$  para o extrato hidroetanólico e  $315 \pm 43,9 \mu\text{g EAG/mg}$  para o extrato aquoso.

Na amostra de Tomilho Bela-luz 2017, o extrato hidroetanólico foi o que apresentou uma maior concentração de compostos fenólicos totais,  $128 \pm 8,4 \mu\text{g EAG/mg}$ , face aos extratos etanólico,  $109 \pm 18,2 \mu\text{g EAG/mg}$ , e aquoso,  $99 \pm 18,6 \mu\text{g EAG/mg}$ .

O subproduto do Tomilho Bela-luz 2016, apresentou uma concentração de compostos fenólicos totais, em equivalentes de ácido gálico, 3 vezes superior em relação ao Tomilho Bela-luz 2017. No entanto, a aplicação de diferentes solventes de extração não influenciou o teor de compostos fenólicos totais nos diferentes extratos obtidos (figura 11).

O teor de compostos fenólicos totais destes subprodutos é superior ao teor de compostos fenólicos de inflorescências, extraídos com água,  $59,93 \pm 0,06 \mu\text{g EAG/mg}$ , etanol:água,  $109,09 \pm 0,46 \mu\text{g EAG/mg}$ , e etanol,  $109,72 \pm 0,35 \mu\text{g EAG/mg}$  (Barros, Heleno, Carvalho, & Ferreira, 2010).

Nos Orégãos o extrato hidroetanólico foi o que apresentou um teor mais elevado de compostos fenólicos totais ( $367 \pm 78,7 \mu\text{g EAG/mg}$ ), seguindo-se o extrato aquoso e o extrato etanólico com um valor médio de compostos fenólicos totais de  $266 \pm 12,7 \mu\text{g EAG/mg}$  e  $201 \pm 36,6 \mu\text{g EAG/mg}$ , respetivamente. Os subprodutos desta espécie, apresentam um teor em compostos fenólicos totais similar ao teor de compostos fenólicos totais de partes aéreas secas que, quando extraídos com água e etanol, apresentam um teor de  $6,4 \pm 0,1 \mu\text{g EAG/mg}$  e de  $13,5 \pm 0,3 \mu\text{g EAG/mg}$ , respetivamente

(Teixeira et al., 2013).

Tendo em consideração os rendimentos de extração obtidos, podemos também calcular o teor total de compostos fenólicos, expressos em mg de equivalentes de ácido gálico, por g de caules (figura 12).

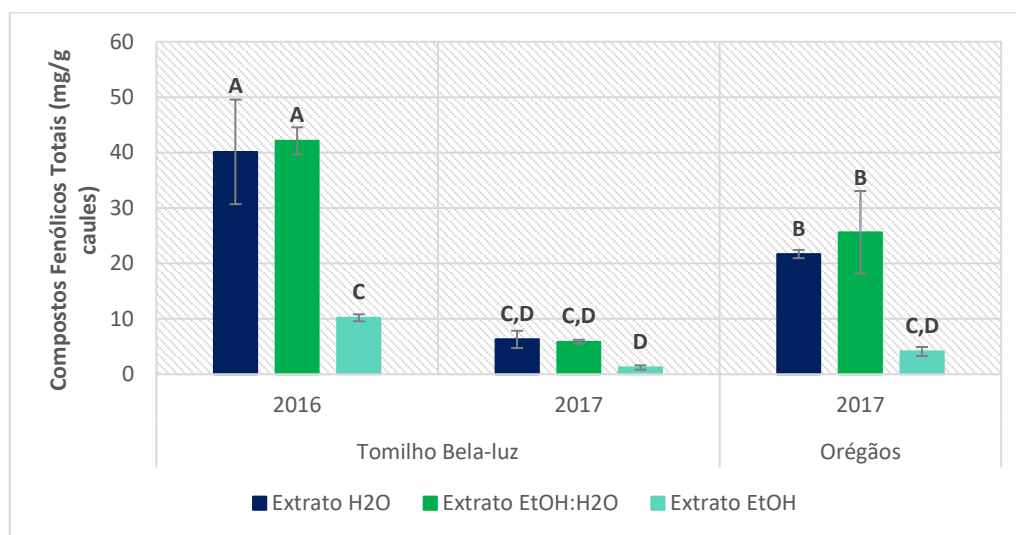


Figura 12 - Quantidade total de compostos fenólicos (mg EAG/g caules) para as diferentes espécies de subprodutos. Os resultados apresentados são a média  $\pm$  desvio-padrão de ensaios independentes. Médias que não compartilham a mesma letra são estatisticamente significativas,  $p \leq 0,05$ .

Se tivermos em conta o rendimento de cada extrato, o teor de compostos fenólicos totais, em equivalentes de ácido gálico, extraídos é 7 vezes superior nos extratos aquoso e hidroetanólico em relação ao extrato etanólico (figura 12). Tendo em conta a quantidade total de compostos fenólicos nos extratos, essa influência não é verificada, pois o extrato etanólico que tem pouco rendimento apresenta o mesmo teor de compostos fenólicos totais, em equivalentes de ácido gálico (figura 11). Podemos concluir que, a escolha do solvente, baseada na sua polaridade, tem um efeito direto no rendimento do conteúdo de compostos fenólicos totais, em equivalentes de ácido gálico, bem como no rendimento de extração dos compostos solúveis em água, água:etanol (50:50) e etanol (figuras 10 e 12), existindo um aumento de extração no teor de compostos fenólicos totais e rendimento de extração dos compostos solubilizados com o aumento da polaridade do solvente. Tendo em conta os rendimentos obtidos e a composição dos extratos o procedimento de extração com água é o mais vantajoso.

### 3.1.2. Análise de carboidratos

Os extratos dos subprodutos, para além de serem constituídos em compostos fenólicos totais, em equivalentes de ácido gálico, são igualmente constituídos por carboidratos. O perfil dos açúcares totais e dos monossacarídeos presentes nos extratos dos subprodutos, obtidos das macerações aquosa, hidroetanólica e etanólica, encontra-se esquematizado na tabela 3.

Os açúcares totais variam entre 619  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , no extrato hidroetanólico dos Orégãos, e 203  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , no extrato etanólico do Tomilho Bela-luz 2017.

Pela análise de açúcares, verifica-se que os extratos para além de serem ricos em glucose, também são em ácidos urónicos. É possível que a elevada quantidade de glucose que se verificou em todos os extratos provém da maior parte dos compostos fenólicos que existem na forma glicosilada (Hopkinson, 1969). O extrato etanólico foi o que apresentou a maior % molar de glucose, com um mínimo de 40% no Tomilho Bela-luz 2017 e 83% no Tomilho Bela-luz 2016. A percentagem molar de ácidos urónicos variou entre 7% no extrato hidroetanólico dos Orégãos e 26% no extrato aquoso do Tomilho Bela-luz 2016. É possível que os ácidos urónicos sejam provenientes dos polissacarídeos pécticos que estão naturalmente presentes nas paredes celulares das plantas (Voragen, Coenen, Verhoef, & Schols, 2009).

A composição dos açúcares livres entre os extratos é similar, sendo a glucose e a frutose, os açúcares maioritários, uma vez que são os açúcares de transporte das plantas na forma de sacarose (Ritsema & Smeekens, 2003). O Tomilho Bela-luz 2016 foi o que apresentou uma menor e maior % molar de glucose que variou entre 28% no extrato hidroetanólico e 59% no extrato etanólico. Em relação à frutose, os extratos hidroetanólicos dos Orégãos e do Tomilho Bela-luz 2016 apresentaram uma % molar de 36% e 58%, respetivamente.

Tabela 3 - Composição dos açúcares totais e monossacarídeos, em % molar, e concentração (m/m) ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) nas diferentes amostras.

	Açúcares (mol %)							Total de açúcares ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) *
	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Fru	UA	
<b>Tomilho Bela-luz 2016</b>								
Extrato H <sub>2</sub> O								
Açúcares totais	6	1	5	7	50		26	210 <sup>C,D,E,F</sup>
Monossacarídeos	12	0		3	45	41		68 <sup>E,F</sup>
Extrato EtOH:H <sub>2</sub> O								
Açúcares totais	7	1	5	7	72		8	285 <sup>B,C,D,E</sup>
Monossacarídeos	10	1		3	28	58		150 <sup>C,D,E,F</sup>
Extrato EtOH								
Açúcares totais	1	1	3	3	83		13	264 <sup>B,C,D,E,F</sup>
Monossacarídeos	3	1		1	59	37		94 <sup>E,F</sup>
<b>Tomilho Bela-luz 2017</b>								
Extrato H <sub>2</sub> O								
Açúcares totais	15	5	7	11	47		15	355 <sup>B,C</sup>
Monossacarídeos	9	3		3	42	42		212 <sup>C,D,E,F</sup>
Extrato EtOH:H <sub>2</sub> O								
Açúcares totais	17	9	5	8	45		16	322 <sup>B,C,D</sup>
Monossacarídeos	11	5		2	40	42		165 <sup>C,D,E,F</sup>
Extrato EtOH								
Açúcares totais	13	12	4	6	40		24	203 <sup>C,D,E,F</sup>
Monossacarídeos	11	13		0	36	40		53 <sup>F</sup>
<b>Orégãos</b>								
Extrato H <sub>2</sub> O								
Açúcares totais	4	8	5	11	61		11	353 <sup>B,C</sup>
Monossacarídeos	2	0		2	48	48		281 <sup>B,C,D,E</sup>
Extrato EtOH:H <sub>2</sub> O								
Açúcares totais	4	10	5	11	63		7	619 <sup>A</sup>
Monossacarídeos	2	6		3	52	36		108 <sup>D,E,F</sup>
Extrato EtOH								
Açúcares totais	3	11	5	11	59		11	469 <sup>A,B</sup>
Monossacarídeos	1	4		5	51	38		164 <sup>C,D,E,F</sup>

\* Os resultados apresentados são a média  $\pm$  desvio-padrão de ensaios independentes. Médias que não compartilham a mesma letra são estatisticamente significativas,  $p \leq 0,05$ .



A tabela 4 resume a concentração em compostos fenólicos totais, em equivalentes de ácido gálico, e em carboidratos obtidos dos extratos dos subprodutos.

*Tabela 4 - Concentração dos compostos fenólicos totais ( $\mu\text{g EAG/mg extrato}$ ) e da concentração do total de açúcares totais e monossacarídeos ( $\mu\text{g/mg}$ ) para as diferentes espécies de subprodutos. Os resultados apresentados são a média  $\pm$  desvio-padrão de ensaios independentes.*

	$\mu\text{g Fenóis totais por extrato em EAG}$	Total de açúcares ( $\mu\text{g/mg}$ )	
		Totais	Monossacarídeos
<b>Tomilho Bela-luz 2016</b>			
Extrato H <sub>2</sub> O	315	210	68
Extrato EtOH:H <sub>2</sub> O	342	285	150
Extrato EtOH	353	264	94
<b>Tomilho Bela-luz 2017</b>			
Extrato H <sub>2</sub> O	99	355	212
Extrato EtOH:H <sub>2</sub> O	128	322	165
Extrato EtOH	109	203	53
<b>Orégãos</b>			
Extrato H <sub>2</sub> O	266	353	281
Extrato EtOH:H <sub>2</sub> O	367	619	108
Extrato EtOH	201	469	164

### 3.1.3. Avaliação da atividade antioxidante

Os compostos fenólicos, presentes nas plantas, são conhecidos pelas suas propriedades biológicas, destacando-se a atividade antioxidante. Por esta mesma razão, foi determinada a atividade antioxidante, pelo método ABTS<sup>+</sup>, das 3 espécies em estudo, apresentando-se os resultados obtidos na figura 13.

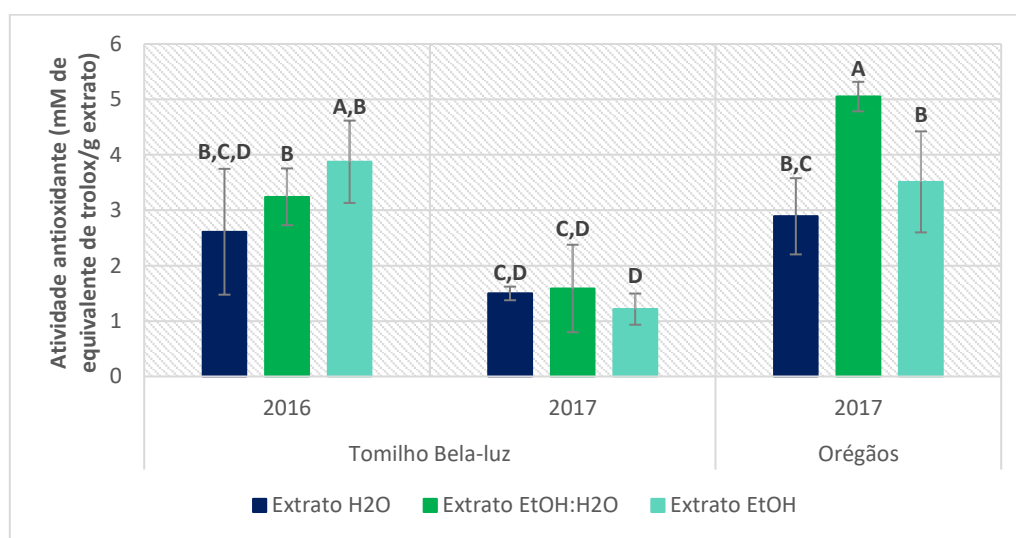


Figura 13 – Atividade antioxidante quantificada nos vários extratos de Tomilho Bela-luz 2016 e 2017 e Orégãos, expressa em Equivalentes em Trolox (mM) por g de extrato. Os resultados apresentados são a média  $\pm$  desvio-padrão de ensaios independentes. Médias que não compartilham a mesma letra são estatisticamente significativas,  $p < 0,05$ .

A atividade antioxidante dos três extratos obtidos de subprodutos de Tomilho Bela-luz 2016, são similares,  $3,9 \pm 0,7$  mM de equivalentes de trolox para o extrato etanólico,  $2,6 \pm 1,1$  mM de equivalentes de trolox para o extrato aquoso e  $3,2 \pm 0,5$  mM de equivalentes de trolox para o extrato hidroetanólico.

Tal como verificado nos compostos fenólico totais, a atividade antioxidante do Tomilho Bela-luz 2017 também apresentou concentrações inferiores, verificando-se uma atividade antioxidante semelhante entre os três extratos dos subprodutos. Os extratos aquoso e hidroetanólico apresentaram uma atividade antioxidante de  $1,5 \pm 0,1$  e  $1,6 \pm 0,8$  mM de equivalentes de Trolox, respetivamente, em relação ao extrato etanólico que revelou a TEAC mais baixa,  $1,2 \pm 0,3$  mM de equivalentes de Trolox.

O extrato hidroetanólico dos Orégãos é significativamente superior ( $5,1 \pm 0,3$  mM de equivalentes de trolox), em relação ao extrato aquoso,  $2,9 \pm 0,7$  mM de equivalentes de trolox, e ao extrato etanólico,  $3,5 \pm 0,9$  mM de equivalentes de trolox.

Os valores obtidos para a atividade antioxidante estão correlacionados com o teor em compostos fenólicos totais, em equivalentes de ácido gálico, sendo esta atividade antioxidante superior nos extratos que apresentaram maior teor de compostos fenólicos totais (figuras 11 e 13). As similaridades

verificadas entre o teor em compostos fenólicos totais, em equivalentes de ácido gálico, e a atividade antioxidante vêm confirmar que há uma correlação entre o conteúdo em compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante (Amensour, Sendra, Abrini, Pérez-Alvarez, & Fernández-López, 2010). Os subprodutos revelaram uma menor atividade antioxidante, em relação aos extratos de folhas, extraídos com água ( $2406,68 \pm 36,86$  mM de equivalentes de trolox) e com etanol ( $2594,34 \pm 75,78$ ) (Amensour et al., 2010).

#### 3.1.4. Avaliação da atividade antimicrobiana

Foi testado o efeito antimicrobiano dos extratos obtidos das diferentes macerações, constituídos por compostos fenólicos totais, em equivalentes de ácido gálico, e por carboidratos (tabela 4), contra a *S. aureus*, *S. enterica* F2 e *E. coli*.

Na placa, foram colocados discos com 10  $\mu$ L (10 mg de extrato/mL) para cada um dos extratos solubilizados, um disco de controlo negativo com 10  $\mu$ L de água estéril e dois discos de controlo positivo contendo os antibióticos, ciprofloxacina e gentamicina, não tendo sido verificado qualquer efeito antimicrobiano para a concentração de 0,1 a 0,37 mg de compostos fenólicos totais, em equivalentes de ácido gálico (figura 14).

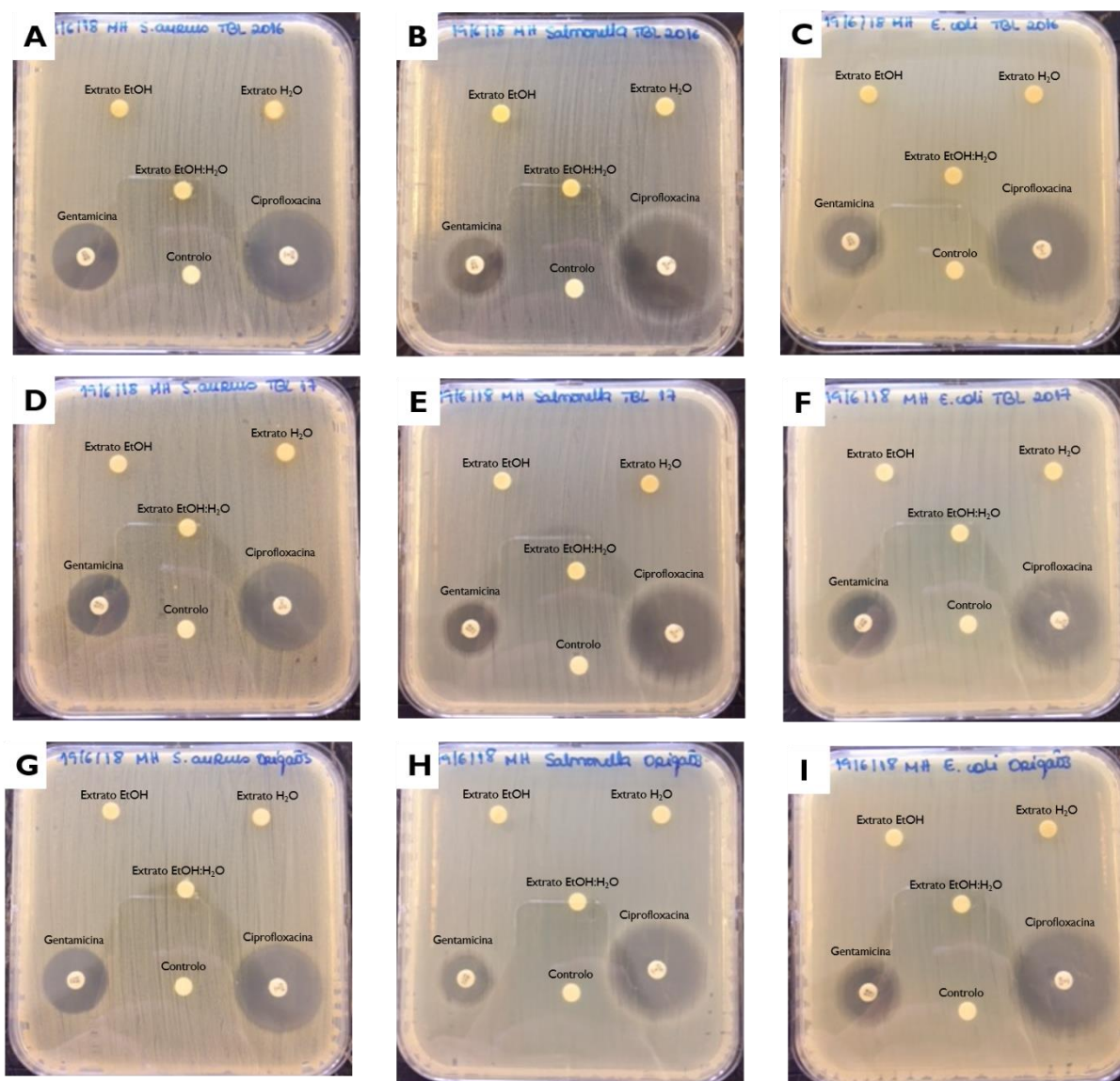


Figura 14 - Resultados dos testes antimicrobianos dos extratos obtidos das macerações (10 µL) do Tomilho Bela-luz 2016 (A, B, C), do Tomilho Bela-luz 2017 (D, E, F), e Orégãos (G, H, I) contra as estirpes *S. aureus* ATCC 6538, *S. enterica* sv *Anatum* SF2 e *E. coli* ATCC 25922, respetivamente.

Os resultados obtidos neste estudo, podem ser explicados pelo facto de os extratos serem constituídos, para além de compostos fenólicos (34% no Tomilho Bela-luz 2016, 11% no Tomilho Bela-luz 2017 e 28% nos Orégãos), por carboidratos, 32%, 29% e 48% de açúcares totais no Tomilho Bela-luz 2016 e 2017 e Orégãos, respetivamente, dos quais 10% no Tomilho Bela-luz 2016, 14% no Tomilho Bela-luz 2017, 18% nos Orégãos são monossacarídeos, potenciando o crescimento das bactérias. A purificação dos extratos é importante uma vez que, o efeito antimicrobiano de extratos de várias famílias de plantas, *Lamiaceae*, *Liliaceae*, *Onagraceae*, entre outras, constituídos apenas por compostos fenólicos, foi testado contra diferentes espécies de bactérias, fungos e leveduras, tendo-se verificado resultados positivos. O extrato de *Thymus vulgaris* (500 µL) mostrou atividade

antimicrobiana leve (1 a 3 mm de inibição) contra a *S. aureus*, e forte atividade antimicrobiana contra a *E. coli* (4 a 10 mm) (Rauha et al., 2000).

### 3.2. Extração dos óleos essenciais por diferentes métodos extrativos: hidrodestilação convencional e hidrodestilação assistida por micro-ondas

Para obtenção do óleo essencial, os subprodutos das espécies foram submetidos a diferentes métodos extrativos, hidrodestilação convencional e hidrodestilação assistida por micro-ondas.

A figura 15 apresenta a comparação entre os rendimentos obtidos por hidrodestilação convencional e hidrodestilação assistida por micro-ondas.

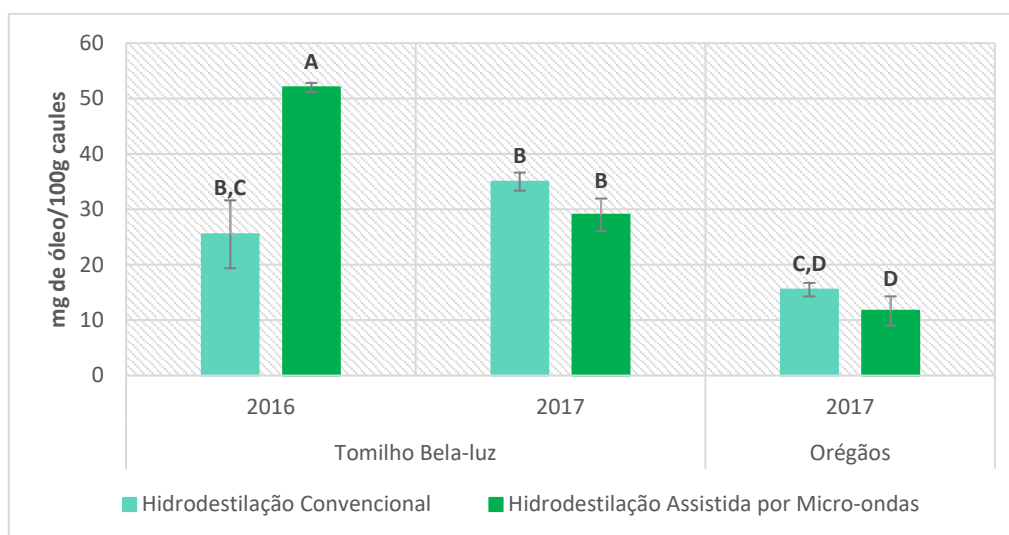


Figura 15 – Rendimento do óleo essencial por g de caules das extrações realizadas por hidrodestilação convencional e hidrodestilação assistida por micro-ondas. Os resultados apresentados são a média  $\pm$  desvio-padrão de ensaios independentes. Médias que não compartilham a mesma letra são estatisticamente significativas,  $p \leq 0,05$ .

Pela análise da figura 15, verifica-se que o óleo essencial do Tomilho Bela-luz de anos diferentes apresentou um maior rendimento em ambas as extrações, comparativamente aos Orégãos. As diferenças observadas ao nível do rendimento entre o Tomilho Bela-luz e os Orégãos estão em concordância com o reportado na literatura, onde se verificou que os caules, folhas e flores do Tomilho, obtiveram o dobro de volume de óleo essencial comparativamente às partes aéreas de Orégãos (Chorianopoulos et al., 2004).

Quando se compara a hidrodestilação convencional e a hidrodestilação assistida por micro-ondas os rendimentos em OE são similares, à exceção do Tomilho Bela-luz 2016 obtido através da hidrodestilação assistida por micro-ondas ( $52 \pm 0,8$  mg de óleo/100 g de caules). Este resultado pode

ser explicado pela heterogeneidade do subproduto, uma vez que o subproduto utilizado para a hidrodestilação assistida por micro-ondas continha uma maior percentagem de folhas juntamente com os caules. Existem evidências de que não há diferenças no rendimento de óleo essencial extraído dos caules da mesma planta colhida em anos diferentes, existindo diferenças no rendimento do óleo essencial extraído de diferentes partes da planta, caules e folhas, havendo um maior rendimento nas folhas (Ngioni et al., 2006). Em relação ao rendimento, em mg de óleo por 100 g de caules, do OE obtido das restantes extrações, o Tomilho Bela-luz 2016 apresentou um rendimento de  $26\pm 6,1$  na hidrodestilação convencional e o Tomilho Bela-luz 2017, obteve um rendimento de  $35\pm 1,6$  e  $29\pm 2,9$ , na hidrodestilação convencional e hidrodestilação assistida por micro-ondas, respetivamente. As extrações do óleo essencial de Orégãos efetuadas tiveram um rendimento de  $16\pm 1,2$  e  $12\pm 2,6$  mg de óleo/100 g de caules hidrodestilação convencional e na hidrodestilação assistida por micro-ondas, respetivamente.

O perfil dos compostos voláteis do OE obtido das duas plantas em estudo é apresentado nos cromatogramas da figura 16, verificando-se que a composição e a concentração dos compostos são similares.

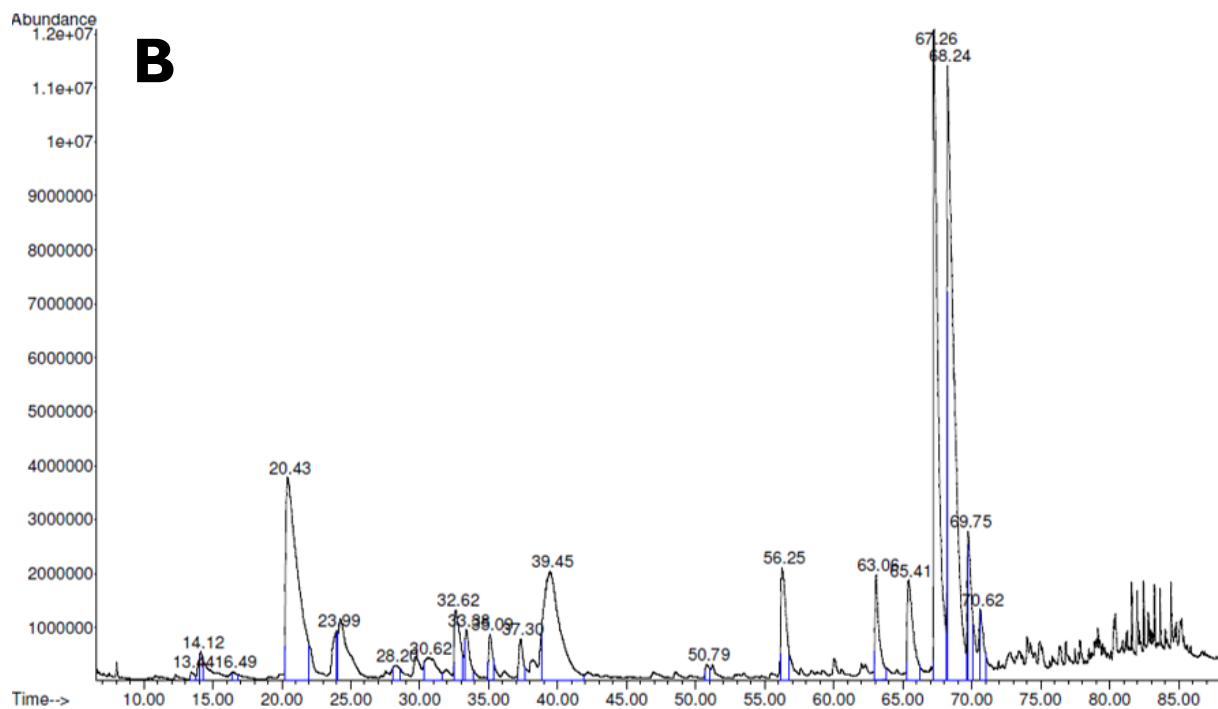
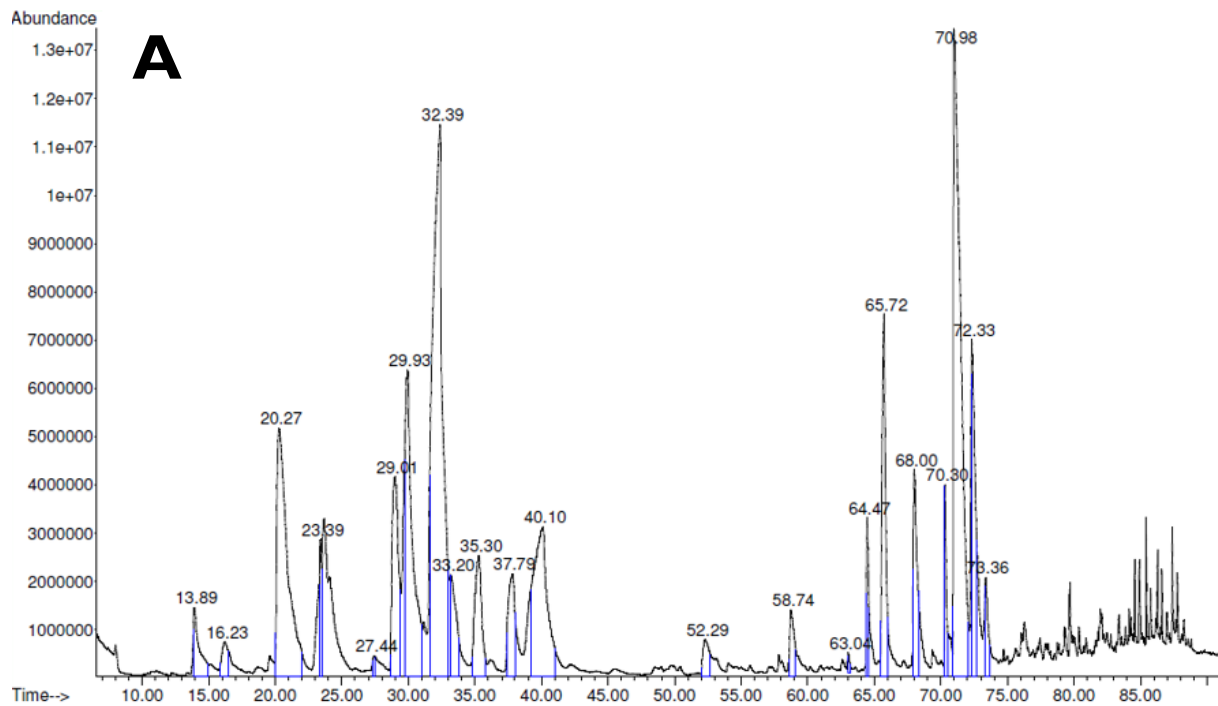


Figura 16 - Cromatograma do perfil dos compostos voláteis dos óleos essenciais de Tomilho Bela-luz 2017 (A) e dos Orégãos (B) obtidos por hidrodestilação assistida por micro-ondas

A identificação com base nos espectros de massa e índices de retenção, tal como a quantificação dos óleos essenciais, obtidos por hidrodestilação convencional e assistida por micro-ondas, dos subprodutos das 2 espécies em estudo apresenta-se esquematizado na tabela 5. Em ambos os métodos extrativos, os totais do número de compostos voláteis, bem como a quantidade de monoterpenóides e sesquiterpenóides, revelaram valores muito similares.

Na extração por hidrodestilação convencional, foram identificados, no geral, um total de 36 compostos, sendo 73% monoterpenóides, 22% sesquiterpenóides e 5% pertencentes a outras famílias químicas e compostos que não foram identificados. Na extração por hidrodestilação assistida por micro-ondas, no geral, foram contabilizados um total de 37 compostos, dos quais 68% são monoterpenóides, 31% são sesquiterpenóides e 1% pertencem a outras classes e compostos que não foram identificados. As espécies da família *Lamiaceae*, como é o caso do *Thymus* e *Origanum*, quer seja em flores, folhas ou caules, na fase de floração ou na fase vegetativa, são constituídas majoritariamente por monoterpenos, e em menor concentração, por sesquiterpenos (Figueiredo, Barroso, Pedro, & Scheefeer, 2007).

Na hidrodestilação convencional, os compostos maioritários na classe dos monoterpenóides, no Tomilho Bela-luz 2016 e 2017, foram o carvacrol (39,2% e 36,7%), o  $\alpha$ -terpineol (30,8% e 33,3%), o borneol (9,1% e 14,5%), o  $\delta$ -terpineol (7,2% e 7,3%), o linalol (4,8% e 4,3%) e, por fim, o timol (3,4% e 0,5%). Na classe dos sesquiterpenóides, o composto que se encontra em maior concentração é o viridiflorol, numa percentagem de 28,1% e 32,1%, o biciclogermacreno, 18,6% e 8,9%, e o  $\beta$ -Bisaboleno, 6,9% e 4,1%.

Na hidrodestilação assistida por micro-ondas, relativamente ao Tomilho Bela-luz de anos diferentes, 2016 e 2017, as diferenças entre ambos reside nas concentrações de cada composto. No Tomilho Bela-luz 2016, para a classe dos monoterpenóides, o composto maioritário foi o carvacrol (39,9%), seguindo-se o  $\alpha$ -terpineol (33,8%), enquanto que no Tomilho Bela-luz 2017 o composto maioritário foi o  $\alpha$ -terpineol, 7%, e o carvacrol, 5%. Quanto aos restantes compostos para a mesma classe, no Tomilho Bela-luz 2016 e 2017, os compostos identificados foram o borneol (9,2% e 3,1%), o  $\delta$ -terpineol (8,3% e 1,4%), o linalol (7% e 4,5%) e, por fim, o timol (0,4% e 0,7%). Já na classe dos sesquiterpenóides, os compostos identificados foram biciclogermacreno, 26,2% e 12,6%, o viridiflorol, 20% e 20,8%, o germacreno D, 11,2% e 10,7% e o  $\beta$ -bisaboleno, 6,1% e 10,8%, respetivamente.



Tabela 5 - Identificação dos compostos voláteis ( $\mu\text{g}$  de composto/ $\text{mg}$  de óleo essencial) dos subprodutos de Tomilho Bela-luz, 2016 e 2017, e Orégãos obtidos por hidrodestilação convencional e hidrodestilação assistida por micro-ondas.

Tomilho Bela-luz								
IR Calculado <sup>a</sup>	IR Literatura <sup>b</sup>	Compostos voláteis	2016		2017		Orégãos	
			Hidrodestilação convencional	Hidrodestilação assistida por micro-ondas	Hidrodestilação convencional	Hidrodestilação assistida por micro-ondas	Hidrodestilação convencional	Hidrodestilação assistida por micro-ondas
<b>Monoterpenóides</b>								
1446	1461	Hidrato sabineno		1,97	1,05±0	8,79±4,9		
1441	1463	Mentona					3,06±0	3,86±1,14
1526	1526	Linalol	26,73±3,62	21,32	9,80±1,37	72,65±24,0	76,53±12,43	127,86±36,27
1564	1576	4-Terpineol	21,17±7,84	2,48	3,11±0,56	6,78±3,2		
1620	1640	$\delta$ -Terpineol	40,35±3,49	25,46	16,48±2,54	40,83±7,7		
1609	1642	L-mentol				1,39±0	8,19±0	3,82±0,81
1654	1664	$\alpha$ -Terpineol	171,86±19,78	103,74	75,48±10,64	163,32±38,0	7,27±1,62	25,93±7,58
1634	1668	Borneol	50,54±1,86	28,09	32,75±7,03	71,84±16,9	2,88±0	12,00±2,47
1695	1697	Geranial				5,3±3,4		
1756	1748	Nerol				3,24±0,7		
1793	1778	Geraniol	3,62±0,73		1,92±0	11,76±4,5	3,64±0	1,93±0
1514	1781	<i>p</i> -8-Cimenol	2,47±0					
1948	1941	Timol	18,75±11,33	1,35	1,08±0,08	4,80±3,5	86,68±14,15	127,19±52,1
1971	1956	Carvacrol	218,87±7,92	122,16	83,00±0,66	149,06±27,0	124,16±17,22	206,29±76,73

1650	2159	Eugenol	3,72±0					
1449		n,i, (m/z 71, 43, 111)			1,77±0,15			2,40±0
1625		n,i, (m/z 59, 81, 93)						3,41±0
<b>Sesquiterpenóides</b>								
1477	1474	Bicicloelemeno		7,25	1,67±0,89	6,76±2,3		4,89±3,6
1625	1635	α-Humuleno					3,97±0	
1663	1672	Germacreno D			2,68±1,23		6,23±3,9	
1510	1516	α-Gurjuneno		0,99				
1561	1568	trans-Cariofileno				10,77±0		
1393	1574	β-Elemeno		4,51				
1561	1581	β-Cariofileno		2,17				6,25±2,7
1605	1625	Aromadendreno		2,42				
1661	1672	Germacreno D		26,76		19,71±0		13,71±4,2
1680	1705	Biciclogermacreno	22,14±0	62,76	10,14±0,45	23,28±9,3	2,5±1,67	18,58±9,3
1701	1714	β-Bisaboleno	8,23±0	14,59	4,66±0,32	19,95±5,0	6,68±4,43	11,68±4,3
1879		1,6-Germacradien-5-ol		17,49	4,39±0,91	6,56±3,4	3,14±0,85	4,32±0
1550	1837	Palustrol	0,62±0					
1829		β-ionona					0,79±0	
1837	1883	Óxido de Cariofileno				10,74±0	21,52±5,92	24,03±7,2
1868	1907	Ledol	2,1±0	1,09	0,77±0,19	1,22±0,4	1,23±0	

1889	1918	Viridiflorol	33,45±13,41	47,74	36,6±6,06	38,41±8,6	20,88±0,43	35,14±13,5
1921	1933	Espatulenol	4,32±0	18,7	13,91±0			32,72±11,2
1676		5-Epi-Neointermedeol	27,2±0	1,56				
2139	2132	τ-Cadinol			4,39±0,35	10,87±1,3	7,49±1,2	
2185	2178	τ-Muurolol	20,93±0					10,33±0,8
1520		n,i, (m/z 71, 43, 81)		1,62				
2005		n,i, (m/z 204, 189, 161)			28,51±0	36,57±5,4	23,68±0,22	
2190		n,i, (m/z 204, 189, 135)		29,92	6,36±0			27,5±5,8
<b>Outros</b>								
1436	1423	1-Octeno-3-ol					1,2±0,17	1,53±0,42
1823	2701	Ácido Tetradecanóico	1,2±0					
1877	2940	Ácido Hexadecanóico	29,34±0					
1864		n,i, (m/z 109, 138, 96)					1,12±0	
1457		n,i, (m/z 121, 93, 107)		1,05				
1919		n,i, (m/z 205, 119, 91)			20,18±0	22,71±3,9	7,28±0	
1917		n,i, (m/z 205, 119, 19)					14,30±0	

	<b>Monoterpenóides</b>	558,07	306,58	226,43	539,76	312,41	514,69
<b>TOTAL</b>	<b>Sesquiterpenóides</b>	118,99	239,58	114,07	184,84	98,12	189,14
	<b>Outros</b>	30,53	1,05	20,18	22,71	23,9	1,53

\* a) Índice de retenção calculado usando a série de alcanos C8-C20; b) Índice de retenção da literatura, reportado de Santos, 2010 (Santos, 2010). Os resultados apresentados são a média ± desvio-padrão de ensaios independentes.

Os óleos essenciais extraídos dos caules de *Thymus mastichina* não apresentam uma composição similar à dos óleos essenciais extraídos de outras partes da planta, nomeadamente, partes aéreas, como folhas e flores. Uma vez que, nos caules desta espécie apresentam como composto maioritário o carvacrol, e para folhas e flores, os compostos maioritários são o 1,8-cineole, o linalol e o limoneno (Ferreira et al., 2012; Miguel et al., 2005; Soriano et al., 1997). Relativamente à classe de terpenos, em ambos os métodos extrativos, os monoterpenóides são a classe predominante em todas as espécies, o que está em concordância com outros estudos realizados, que estudaram a composição do OE de 3 espécies de *Thymus* colhidas durante a fase vegetativa e verificaram que eram compostos, predominantemente, por monoterpenos oxigenados (61-76%) (Miguel et al., 2005).

À semelhança das outras amostras, também nos Orégãos, tanto na hidrodestilação convencional como na hidrodestilação assistida por micro-ondas, na classe dos monoterpenóides o composto que se encontra em maior concentração foi o carvacrol (39,7% e 14,9%, respetivamente). A diferença dos Orégãos para com o Tomilho Bela-luz, 2016 e 2017, reside na concentração do timol, que neste subproduto se encontra em maior concentração relativamente à outra espécie. O timol apresentou uma percentagem de 27,8% e 10,1%, seguindo-se o linalol, 24,5% e 7,1%, o  $\alpha$ -terpineol, 2,3% e 1,5%, e o borneol, 0,9% e 0,5%. Relativamente à classe dos sesquiterpenóides, o viridiflorol, 21,3% e 18,6%, o  $\beta$ -bisaboleno, 6,2% e 6,8%, o germacreno D, 6,4% e 7,3%, e o Bicyclgermacreno, 2,5% e 9,8%, respetivamente na hidrodestilação convencional e hidrodestilação assistida por micro-ondas. A composição do OE dos caules de Orégãos apresentam uma composição semelhante à dos óleos essenciais extraídos de outras partes da planta, onde são identificados o carvacrol, o timol, o  $\gamma$ -terpineno, o  $\beta$ -bisaboleno e o borneol, como sendo os compostos maioritários (Galego et al., 2008; Kulisic, Radonic, Katalinic, & Milos, 2004; Ugalde et al., 2016).

Nos óleos essenciais dos Orégãos também foi identificado o composto 1-Octeno-3-ol no entanto a sua presença não está associada à composição do OE (Galego et al., 2008; Ugalde et al., 2016) mas pode advir da contaminação microbiológica por bolores (Salvador et al., 2013). A possível contaminação durante o processamento ou armazenamento poderá ser um ponto crítico na estabilização deste produto ou subproduto.

A composição dos óleos essenciais das diferentes espécies e de anos diferentes manteve-se relativamente constante, prevalecendo duas classes de compostos que são maioritárias: monoterpenóides e sesquiterpenóides. Contudo, verifica-se que existem algumas variações na concentração de cada um dos compostos. Estes resultados levam-nos a concluir que, o método de extração não influencia a composição relativa dos óleos essenciais, mas sim a sua concentração. Relativamente aos compostos terpénicos com possível atividade antimicrobiana, o carvacrol e o timol

são extraídos em maior quantidade por hidrodestilação assistida por micro-ondas.

Comparando os resultados obtidos neste estudo com os obtidos por outros autores e referenciados neste trabalho, podemos concluir que a composição dos OE das diferentes espécies, bem como as concentrações dos compostos maioritários, estão em concordância (Daferera, Tarantilis, & Polissiou, 2002; Figiel, Szumny, Gutiérrez-Ortiz, & Carbonell-Barrachina, 2010; Hudaib et al., 2002; Nickavar et al., 2005; Russo, Galletti, Bocchini, & Carnacini, 1998).

O rendimento e composição dos OE são muito similares em ambos os métodos de extração sendo a hidrodestilação assistida por micro-ondas o método mais rentável visto que, a duração do processamento é 4 vezes inferior.

### 3.3.Extração do óleo essencial do Tomilho Bela-luz 2016 obtido com diferentes solventes na extração líquido-líquido

Tendo em conta o baixo rendimento em OE proveniente dos subprodutos, não foi possível a separação do OE por diferença de densidade. Os hidrodestilados foram submetidos a uma extração líquido-líquido com dois solventes, o diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) e o *n*-hexano ( $\text{C}_6\text{H}_{14}$ ), estes resultados apresentam-se esquematizados na figura 17.

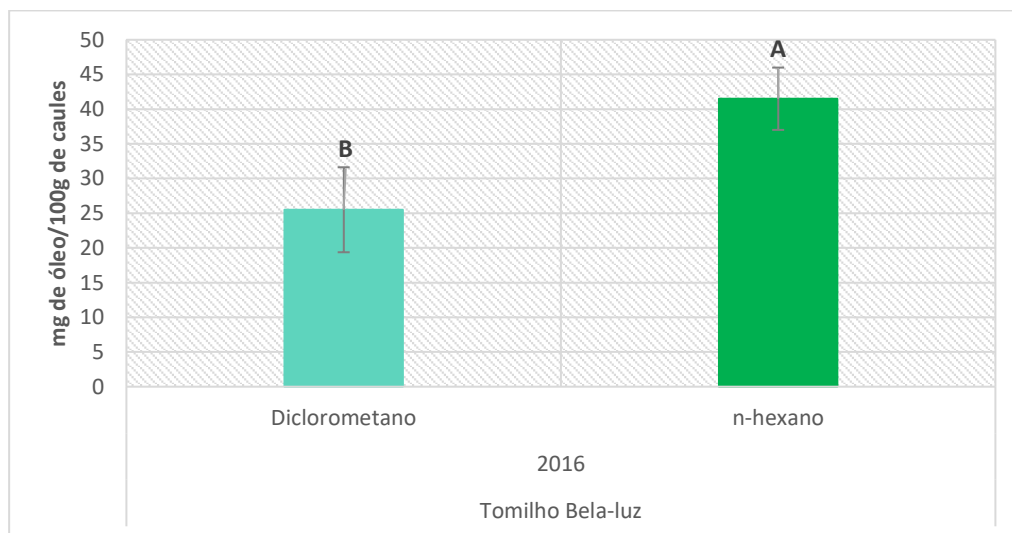


Figura 17 - Rendimento do óleo essencial por g de caules das extrações realizadas por hidrodestilação convencional e extração líquido-líquido com diferentes solventes. Os resultados apresentados são a média  $\pm$  desvio-padrão de ensaios independentes. Médias que não compartilham a mesma letra são estatisticamente significativas,  $p \leq 0,05$ .

Comparando o rendimento de óleo essencial obtido dos subprodutos de Tomilho Bela-luz 2016 efetuando uma extração líquido-líquido com diclorometano ou *n*-hexano podemos verificar pela

análise da fig. 17 que a extração líquido-líquido com *n*-hexano apresentou um maior rendimento, em mg de óleo por 100 g de caules,  $42 \pm 5,5$ , quando comparado com a extração líquido-líquido com diclorometano que apresentou um rendimento de  $26 \pm 7,5$ .

Na tabela 6 apresenta-se esquematizada a composição dos compostos voláteis do óleo essencial do Tomilho Bela-luz 2016, obtido por hidrodestilação convencional e recuperado na extração líquido-líquido com os solventes diclorometano e *n*-hexano.

Na extração líquido-líquido com diclorometano foram identificados um total de 19 compostos voláteis dos quais 82% são monoterpenóides, 14% sesquiterpenóides e 5% ácidos gordos. No que diz respeito à classe dos monoterpenóides, para este tipo de extração os compostos que se apresentam em maior quantidade foram o carvacrol (39,2%), o  $\alpha$ -terpineol (30,8%), o borneol (9,1%), o  $\delta$ -terpineol (7,2%), o linalol (4,8%) e, por fim, o timol (3,4%). Na classe dos sesquiterpenóides, o composto que se encontra em maior concentração é o viridiflorol, numa percentagem de 28,1%, o biciclogermacreno, 18,6%, e o  $\beta$ -bisaboleno, 6,9%.

Relativamente à extração líquido-líquido com *n*-hexano, foram extraídos um total de 18 compostos, sendo 84% monoterpenóides, 11% sesquiterpenóides e 5% são ácidos gordos. Quanto à classe dos monoterpenóides, ao contrário da extração líquido-líquido com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , neste tipo de extração, o composto que se apresenta em maior percentagem é o  $\alpha$ -terpineol, 32,7%, seguindo-se o carvacrol, 30,9%, o linalol, 11,7%, o borneol, 9,2%, o  $\delta$ -terpineol, 7,4%, e o timol com uma percentagem de apenas 1%. Na classe dos sesquiterpenóides estão presentes em maior concentração o viridiflorol e o biciclogermacreno com uma percentagem de 36,2% e 31%, respetivamente.

Como podemos verificar pela análise da tabela 6, apesar do rendimento em óleo essencial dos subprodutos de Tomilho Bela-luz 2016 apresentarem um rendimento superior quando extraídos com *n*-hexano a concentração dos monoterpenóides alvo, com possível atividade antimicrobiana, como é o caso do carvacrol e do timol é superior quando é usada a extração com diclorometano, tendo-se optado por este solvente.

Tabela 6 - Identificação dos compostos voláteis ( $\mu\text{g}$  de composto/ $\text{mg}$  de óleo essencial) do óleo essencial de Tomilho Bela-luz 2016 obtidos por hidrodestilação convencional e com separação do hidrodestilado por extração líquido-líquido com diferentes solventes orgânicos, diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) e *n*-hexano ( $\text{C}_6\text{H}_{14}$ ).

IR Calculado <sup>a</sup>	IR Literatura <sup>b</sup>	Compostos voláteis	Tomilho Bela-luz 2016	
			$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	$\text{C}_6\text{H}_{14}$
<b>Monoterpenóides</b>				
1526	1526	Linalol	26,73 $\pm$ 3,62	65,07 $\pm$ 0
1564	1576	4-Terpineol	21,17 $\pm$ 7,84	37,97 $\pm$ 0
1620	1640	$\delta$ -Terpineol	40,35 $\pm$ 3,49	41,01 $\pm$ 0,18
1654	1664	$\alpha$ -Terpineol	171,86 $\pm$ 19,78	182,34 $\pm$ 5,32
1634	1668	Borneol	50,54 $\pm$ 1,86	51,16 $\pm$ 0,5
1793	1778	Geraniol	3,62 $\pm$ 0,73	2,28 $\pm$ 0,06
1514	1781	<i>p</i> -8-Cimeno	2,47 $\pm$ 0	
1948	1941	Timol	18,75 $\pm$ 11,33	5,77 $\pm$ 1,97
1971	1956	Carvacrol	218,87 $\pm$ 7,92	172,69 $\pm$ 22,17
1650	2159	Eugenol	3,72 $\pm$ 0	
<b>Sesquiterpenóides</b>				
1680	1705	Biciclogermacreno	22,14 $\pm$ 0	22,48 $\pm$ 0
1701	1714	$\beta$ -Bisaboleno	8,23 $\pm$ 0	
1879		1,6-Germacredien-5-ol		1,06 $\pm$ 0
1550	1837	Palustrol	0,62 $\pm$ 0	
1868	1907	Ledol	2,1 $\pm$ 0	1,39 $\pm$ 0
1889	1918	Viridiflorol	33,45 $\pm$ 13,41	26,26 $\pm$ 4,8
1921	1933	Espatuleno	4,32 $\pm$ 0	21,46 $\pm$ 0
1676		5-Epi-Neointermedeol	27,2 $\pm$ 0	
2185	2178	$\tau$ -Muurolo	20,93 $\pm$ 0	
<b>Ácidos Gordos</b>				
1823	2701	Ácido Tetradecanóico	1,2 $\pm$ 0	
1877	2940	Ácido Hexadecanóico	29,34 $\pm$ 0	18,09 $\pm$ 0
1909	2968	Ácido Heptadecanóico		0,86 $\pm$ 0
1945	3181	Ácido Octadecanóico		2,38 $\pm$ 0
1951		Ácido 9-octadecenóico		9,18 $\pm$ 0
1973	3292	Ácido Linoleico		2,39 $\pm$ 0
<b>Monoterpenóides</b>			558,07	558,3
<b>Sesquiterpenóides</b>			118,99	72,64
<b>Ácidos Gordos</b>			30,53	32,91
<b>TOTAL</b>				

\* a) Índice de retenção calculados usando a série de alcanos C8-C20; b) Índice de retenção da literatura, reportado de Santos, 2010 (Santos, 2010). Os resultados apresentados são a média  $\pm$  desvio-padrão de ensaios independentes.

### 3.4. Atividade antimicrobiana

Para avaliação do efeito dos óleos essenciais dos subprodutos estudados começou-se por injetar 2 µL de cada óleo essencial contra as diferentes estirpes: *S. aureus* ATCC 6538, *E. coli* ATCC 25922 e *S. entérica* sv Anatum SF2, figuras 18 e 19. Contudo, verificaram-se dois efeitos opostos: no caso da *S. aureus*, esta mostrou uma forte atividade antimicrobiana que, a concentração foi diminuída até 1 e 0,5 µL de óleo essencial; por outro lado, para a *E. coli* e *S. enterica* F2 a concentração teve que ser aumentada até um mínimo de 10 µL de óleo essencial. Na figura 18, encontra-se uma representação do efeito antimicrobiano com 0,5 µL dos óleos essenciais dos subprodutos contra a *S. aureus*.



Figura 18 – Resultados dos testes antimicrobianos dos óleos essenciais, com uma concentração de 0,5 µL de OE, dos vários subprodutos contra *S. aureus*

Na tabela 7, encontram-se esquematizados os resultados dos testes antimicrobianos contra *S. aureus*, para os óleos essenciais de Tomilho Bela-luz, 2016 e 2017, e Orégãos, com 0,5 e 1 µL de OE.

Tabela 7 - Halo de inibição, em cm, das amostras e dos antibióticos testadas contra a *S. aureus*. Os resultados apresentados são a média  $\pm$  desvio-padrão de ensaios independentes. Médias que não compartilham a mesma letra são estatisticamente significativas,  $p \leq 0,05$ .

	<i>S. aureus</i>	
	0,5 µL de Óleo Essencial	1 µL de Óleo Essencial
<b>Ciprofloxacina</b>	2,6 $\pm$ 0,12 <sup>a,b</sup>	2,9 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>
<b>Gentamicina</b>	2,9 $\pm$ 0 <sup>a,b</sup>	2,5 $\pm$ 0,31 <sup>b</sup>
<b>Tomilho Bela-luz 2016</b>	3,1 $\pm$ 0,42 <sup>a,b</sup>	4 $\pm$ 0 <sup>a</sup>
<b>Tomilho Bela-luz 2017</b>	2,3 $\pm$ 0,24 <sup>b</sup>	4 $\pm$ 0 <sup>a</sup>
<b>Orégãos 2017</b>	3,3 $\pm$ 0,28 <sup>a</sup>	4 $\pm$ 0 <sup>a</sup>



A resposta de inibição, com 1  $\mu\text{L}$  de óleo essencial dos subprodutos, contra a *S. aureus* foi significativamente superior aos antibióticos testados. O efeito de inibição dos óleos essenciais dos subprodutos revelou halos de inibição muito elevados, pelo que a concentração dos OE teve que ser reduzida de 1 para 0,5  $\mu\text{L}$ . Com 0,5  $\mu\text{L}$  de OE de cada amostra estudada contra a *S. aureus*, os halos observados são similares aos observados para os antibióticos.

A figura 19 mostra o efeito dos óleos essenciais de Tomilho Bela-luz 2017 e Orégãos, com concentrações de 10, 15 e 20  $\mu\text{L}$ , contra as estirpes *E. coli* ATCC 25922 e *Salmonella enterica* sv Anatum SF2.

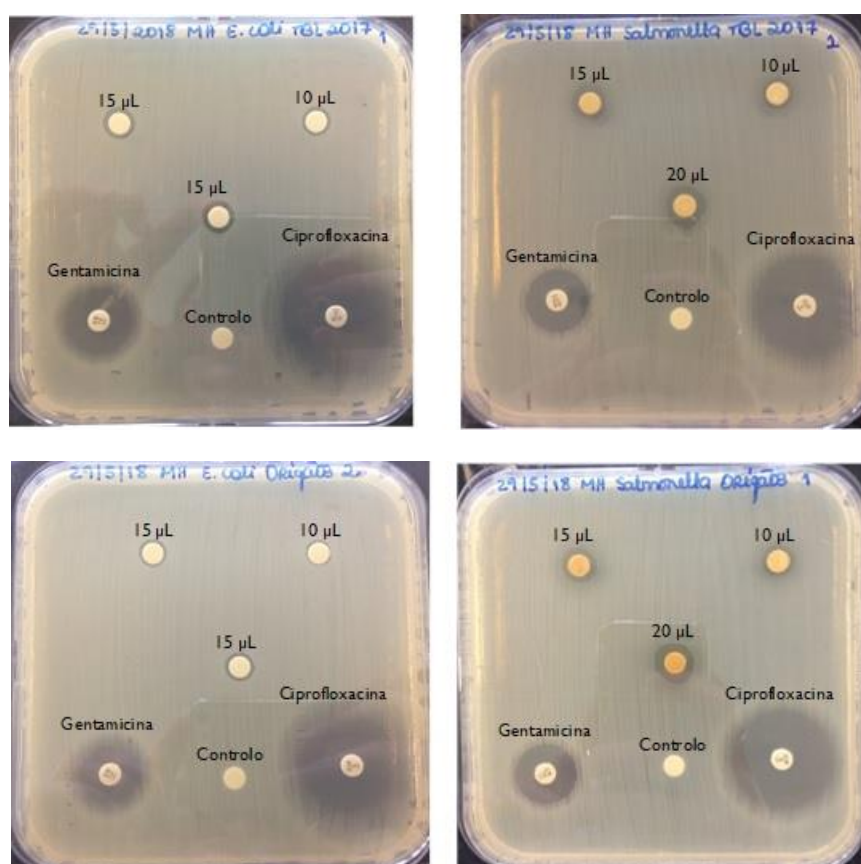


Figura 19 - Resultados dos testes antimicrobianos dos óleos essenciais, em várias concentrações, do Tomilho Bela-luz 2017 e Orégãos contra as estirpes *E. coli* ATCC 25922 (foto à esquerda) e *S. enterica* sv Anatum SF2 (foto à direita).

Na tabela 8 apresentam-se os resultados dos halos de inibição, em cm, obtidos com diferentes concentrações de óleo essencial de Tomilho Bela-luz 2017 e Orégãos, contra as bactérias *E. coli* e *Salmonella* F2.

Tabela 8 - Halo de inibição (cm) dos antibióticos e dos óleos essenciais de Tomilho Bela-luz 2017 e Orégãos, em diferentes concentrações, contra as estirpes *E. coli* ATCC 25922 e *Salmonella enterica* sv *Anatum* SF2. Os resultados apresentados são a média  $\pm$  desvio-padrão de ensaios independentes. Médias que não compartilham a mesma letra são estatisticamente significativas, considerando  $p$ -value  $\leq 0,05$ .

$\mu$ L de OE	Tomilho Bela-luz 2017			Orégãos			Ciprofloxacina	Gentamicina
	10	15	20	10	15	20		
<i>E. coli</i>	0,9 $\pm$ 0,1 <sup>c</sup>	0,9 $\pm$ 0,1 <sup>c</sup>	1,1 $\pm$ 0,1 <sup>c</sup>	0,8 $\pm$ 0 <sup>c</sup>	0,8 $\pm$ 0,1 <sup>c</sup>	0,9 $\pm$ 0,1 <sup>c</sup>	3,4 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	1,9 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>
<i>S. enterica</i> F2	0,9 $\pm$ 0,1 <sup>d</sup>	0,9 $\pm$ 0,1 <sup>c,d</sup>	1,2 $\pm$ 0,1 <sup>c</sup>	1,0 $\pm$ 0 <sup>d</sup>	1,2 $\pm$ 0,1 <sup>c</sup>	1,3 $\pm$ 0,1 <sup>c</sup>	2,9 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	1,9 $\pm$ 0 <sup>b</sup>

A concentração de óleo essencial do Tomilho Bela-luz 2017 foi aumentada de 10 até 20  $\mu$ L, para verificar se havia diferenças estatisticamente significativas no halo de inibição contra as estirpes. Como podemos observar pela análise da tabela 8, aumentando a concentração de OE em mais 10  $\mu$ L, verificamos que os diferentes valores obtidos nos halos de inibição não são estatisticamente significativos contra a *E. coli*. Ainda na mesma espécie, relativamente à *Salmonella* F2 verificam-se diferenças estatisticamente significativas no efeito antimicrobiano, aumentando a concentração em 10  $\mu$ L de OE. O efeito dos OE dos caules de Tomilho Bela-luz de anos diferentes, mostraram uma atividade antimicrobiana, à de OE extraídos de flores e folhas de *Thymus mastichina*, com uma concentração inferior (3  $\mu$ L de OE), contendo os mesmos compostos (linalol, borneol, entre outros), contra as espécies *S. aureus*, *E. coli* e *Salmonella*, tendo sido a *S. aureus*, a bactéria que revelou um maior halo de inibição, seguindo-se as restantes espécies (Faleiro et al., 2003; Smith-Palmer, Stewart, & Fyfe, 1998).

Quanto ao óleo essencial de Orégãos, aumentando a concentração de OE em 10, 15 ou 20  $\mu$ L, não se verificam diferenças significativas no aumento do halo de inibição contra a *E. coli*. No que diz respeito à bactéria *Salmonella* F2, podemos constatar que há diferenças estatisticamente significativas na inibição se se aumentar a concentração do OE em mais 5 ou 10  $\mu$ L. O OE extraído dos caules de Orégãos, apresentam uma atividade muito similar aos OE obtidos comercialmente, compostos por carvacrol, timol, linalol, entre outros, aplicado em diferentes concentrações (5, 10 e 15  $\mu$ L de OE). A atividade antimicrobiana destes óleos essenciais revelou uma maior atividade antimicrobiana contra a *S. aureus*, existindo um aumento de inibição com o aumento da concentração de OE, não se tendo verificado o mesmo comportamento para a *E. coli* e para a *Salmonella* (Ugalde et al., 2016).

As diferenças verificadas em relação ao efeito dos OE dos subprodutos de Tomilho Bela-luz e Orégãos, contra as diferentes estirpes, com altas concentrações de carvacrol e timol, normalmente mostram maior inibição contra Gram (+) do que contra Gram (-) (Edris, 2007), essencialmente devido

à ação dos compostos carvacrol e timol (Silva et al., 2010).

A parede celular é uma estrutura rígida que está presente na maioria das bactérias, que contém polímeros conhecidos como peptidoglicanas, sendo os responsáveis pela sua rigidez. Esta impede que a célula sofra lise celular, atuando como uma barreira protetora contra determinados agentes bacterianos, químicos e físicos externos. A parede celular das bactérias Gram (+) apresenta uma elevada camada de peptidoglicana, que constitui uma espessa camada ao redor da célula, podendo, também, estar presentes na camada outros polímeros, tais como polissacarídeos e uma pequena quantidade de lípidos (Vieira & Fernandes, 2012; Willey, Sherwood, & Woolverton, 2008). Nas bactérias Gram (-) o teor de peptidoglicanas é muito reduzido, sendo principalmente constituídas por lipoproteínas, fosfolípidios, proteínas e lipopolissacarídeos, tornando assim a composição da parede celular destas bactérias mais complexa (Vieira & Fernandes, 2012; Willey et al., 2008).

Posto isto, podemos concluir que apesar das bactérias Gram (+) serem constituídas por uma larga camada de peptidoglicanas, que protege a célula, estas são mais suscetíveis aos compostos bioativos do OE dos subprodutos estudados. Isto pode ser explicado por os OE nas bactérias Gram (+) interagirem diretamente com a membrana celular enquanto que, nas bactérias Gram (-), há impedimento à entrada de substâncias hidrofóbicas como os óleos essenciais (Dhifi et al., 2016; Smith-Palmer et al., 1998).

## 4. CONCLUSÃO

Os extratos aquosos e hidroetanólicos de todas as espécies estudadas foram os que apresentaram um maior rendimento na extração e de compostos fenólicos totais, em equivalentes de ácido gálico, por subproduto. O extrato hidroetanólico dos Orégãos foi o que apresentou uma maior atividade antioxidante e uma maior concentração de açúcares totais, 619 µg/mg. A glucose e a frutose foram os monossacarídeos em maior concentração.

Em ambas as hidrodestilações, convencional e assistida por micro-ondas, o Tomilho Bela-luz apresentou um maior rendimento em óleo essencial do que os Orégãos. As duas espécies revelaram uma composição e concentração de compostos voláteis muito similar em ambos os métodos. Os compostos terpênicos, como o carvacrol e o timol, dos óleos essenciais dos subprodutos apresentaram uma concentração inferior quando extraídos por hidrodestilação convencional, pelo que a hidrodestilação assistida por micro-ondas poderá ser vantajosa.

Na extração líquido-líquido, o *n*-hexano, solvente que pode ser utilizado para rações animais, refletiu um maior rendimento em óleo essencial em relação ao diclorometano, contudo com uma concentração inferior em carvacrol e timol.

Relativamente aos testes antimicrobianos dos diferentes óleos essenciais das amostras em estudo, a *S. aureus* ATCC 6538, foi a estirpe que revelou um maior efeito antimicrobiano, com apenas 0,5 µL de óleo essencial. O óleo essencial de Tomilho Bela-luz 2017 e Orégãos também tiveram atividade antimicrobiana contra a *E. coli* e *S. enterica* F2 com 10 µL do óleo essencial.

Após a valorização dos compostos extratáveis em soluções aquosas, hidroetanólicas ou etanólicas, conjuntamente com o óleo essencial dos subprodutos destas plantas, obtém-se um resíduo rico em fibra insolúvel que poderá ser valorizado em outras aplicações, promovendo a total valorização destes subprodutos.

Este trabalho permite concluir que os óleos essenciais extraídos dos subprodutos de Tomilho Bela-luz e de Orégãos têm atividade antimicrobiana contra as principais espécies que infetam as aves.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABED, N. El, Kaabi, B., Smaali, M. I., Chabbouh, M., Habibi, K., Mejri, M., Ahmed, S. B. H. (2014). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities with its preservative effect against *Listeria monocytogenes* inoculated in minced beef meat. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014, 1–11.
- ALBANO, S. M., & Miguel, M. G. (2011). Biological activities of extracts of plants grown in Portugal. *Industrial Crops and Products*, 33, 338–343.
- ALVES, L. (2014). Processamento de PAM secas. Retrieved May 3, 2018, from [https://epam.pt/wp-content/uploads/2015/02/Guia\\_epam\\_processamento\\_fev2015.pdf](https://epam.pt/wp-content/uploads/2015/02/Guia_epam_processamento_fev2015.pdf)
- AMENSOUR, M., Sendra, E., Abrini, J., Pérez-Alvarez, J., & Fernández-López, J. (2010). Antioxidant activity and total phenolic compounds of myrtle extracts. *CyTA - Journal of Food*, 8, 95–101.
- ASSOCIAÇÃO EMPRESARIAL DE PORTUGAL. (2011). Manual de Gestão de Resíduos Industriais. Retrieved June 9, 2018, from [http://residuosmenos.aeportugal.pt/Downloads/Manual de Gestão de Resíduos Industriais\\_v2.pdf](http://residuosmenos.aeportugal.pt/Downloads/Manual%20de%20Gest%C3%A3o%20de%20Res%C3%ADuos%20Industriais_v2.pdf)
- BAKKALI, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446–475.
- BALASUNDRAM, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99, 191–203.
- BARROS, L., Heleno, S., Carvalho, A. M., & Ferreira, I. (2010). Lamiaceae often used in Portuguese folk medicine as a source of powerful antioxidants: Vitamins and phenolics. *LWT - Food Science and Technology*, 43, 544–550.
- BISHT, D., Chanotiya, C. S., Rana, M., & Semwal, M. (2009). Variability in essential oil and bioactive chiral monoterpene compositions of Indian oregano (*Origanum vulgare* L.) populations from northwestern Himalaya and their chemotaxonomy. *Industrial Crops & Products*, 30, 422–426.
- BOGAARD, A. E. Van Den, & Stobberingh, E. E. (2000). Epidemiology of resistance to antibiotics Links between animals and humans. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 14, 327–335.
- BRENES, A., & Roura, E. (2010). Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action. *Animal Feed Science and Technology*, 158, 1–14.

- BROETTO, F., Gomes, E. R., & Joca, T. A. C. (2017). *O Estresse das Plantas: Teoria & Prática*. (A. Cultura, Ed.). São Paulo: Conselho Editorial Acadêmico.
- CARLSON, M. S., & Fangman, T. J. (2000). Swine Antibiotics and Feed Additives: Food Safety Considerations. *Mu Extension*, 1–6.
- CARVALHO, R. (2012). *Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial Thymus mastichina*. Universidade da Beira Interior.
- CHORIANOPOULOS, N., Kalpoutzakis, E., Aligiannis, N., Mitaku, S., Nychas, G.-J., & Haroutounian, S. A. (2004). Essential Oils of Satureja, Origanum, and Thymus Species: Chemical Composition and Antibacterial Activities Against Foodborne Pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 8261–8267.
- COELHO, E., Rocha, M. A. M., Moreira, A. S. P., Domingues, M. R. M., & Coimbra, M. A. (2016). Revisiting the structural features of arabinoxylans from brewers' spent grain. *Carbohydrate Polymers*, 139, 167–176.
- COSENTINO, S., Tuberoso, C. I. G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., & Arzedi, E. (1999). In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. *Letters in Applied Microbiology*, 29, 130–135.
- DAFERERA, D. J., Tarantilis, P. A., & Polissiou, M. G. (2002). Characterization of Essential Oils from Lamiaceae Species by Fourier Transform Raman Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5503–5507.
- DHIFI, W., Bellili, S., Jazi, S., Bahloul, N., & Mnif, W. (2016). Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. *Medicines*, 3, 1–16.
- DIREÇÃO GERAL DA SAÚDE. (2015). *Ervas Aromáticas - Uma estratégia para a Redução do Sal na Alimentação dos Portugueses*. Lisboa: Programa Nacional para a Promoção da Alimentação Saudável.
- EDRIS, A. E. (2007). Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents: A Review. *Phytotherapy Research*, 323, 308–323.
- ERLANGUNG, Z. (1977). *Biosynthesis of the phenolic monoterpenes, thymol and carvacrol, by terpene synthases and cytochrome P450s in oregano and thyme*. Universität Jena.
- ERVITAL. (2018). Ervital Naturalmente. Retrieved February 3, 2018, from <http://www.ervital.pt/>

- FALEIRO, M. L., Miguel, M. G., Ladeiro, F., Venâncio, F., Tavares, R., Brito, J. C., Pedro, L. G. (2003). Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*. *Letters in Applied Microbiology*, 36, 35–40.
- FARAHANI, H. A., Valadabadi, S. A., Daneshian, J., & Khalvati, M. A. (2009). Evaluation changing of essential oil of balm (*Melissa officinalis* L.) under water deficit stress conditions. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3, 329–333.
- FERREIRA, A. (2014). Secagem e Acondicionamento de PAM. Retrieved February 3, 2018, from <http://epam.pt/guia/guia-secagem-acondicionamento-pam/>
- FERREIRA, A., Coelho, I. S., Saraiva, I., Dargent, L., Serrano, M. do C., & Ferreira, M. E. (2012). Plantas aromáticas e medicinais: Produção e valor económico. Retrieved June 7, 2018, from [http://www.cebal.pt/images/publicacao\\_pam.pdf](http://www.cebal.pt/images/publicacao_pam.pdf)
- FERREIRA, D., Guyot, S., Marnet, N., Delgadillo, I., Renard, C. M. G. C., & Coimbra, M. A. (2002). Composition of phenolic compounds in a Portuguese pear (*Pyrus communis* L. var. S. Bartolomeu) and changes after sun-drying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4537–4544.
- FIGIEL, A., Szumny, A., Gutiérrez-Ortíz, A., & Carbonell-Barrachina, Á. A. (2010). Composition of oregano essential oil (*Origanum vulgare*) as affected by drying method. *Journal of Food Engineering*, 98, 240–247.
- FIGUEIREDO, A. C., Barroso, J. G., & Pedro, L. G. (2007). Plantas aromáticas e medicinais. Factores que afectam a produção. In *Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais* (3rd ed., pp. 1–18). Lisboa: Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- FIGUEIREDO, C., Barroso, J., Pedro, L., & Scheefeer, J. (2007). Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 22, 206–213.
- FITZGERALD, J. R. (2012). Livestock-associated *Staphylococcus aureus*: Origin, evolution and public health threat. *Trends in Microbiology*, 20, 192–198.
- GABINETE DE PLANEAMENTO E POLÍTICAS. (2013). *As plantas aromáticas e medicinais e condimentares*. Ministério da Agricultura e do Mar. Governo de Portugal.
- GALEGO, L., Almeida, V., Gonçalves, V., Costa, M., Monteiro, I., Matos, F., & Miguel, G. (2008). Antioxidant activity of the essential oils of *Thymbra capitata*, *Origanum vulgare*, *Thymus mastichina*, and *Calamintha baetica*. *Plants as Food and Medicine*, 765, 325–334.

- GAVARIĆ, N., Kovač, J., Kretschmer, N., Kladar, N., Možina, S. S., Bucar, F., Božin, B. (2015). *Natural Products as Antibacterial Agents — Antibacterial Potential and Safety of Post- distillation and Waste Material from Thymus vulgaris L., Lamiaceae.*
- GUARDA, A., Rubilar, J. F., Miltz, J., & Galotto, M. J. (2011). The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. *International Journal of Food Microbiology, 146*, 144–150.
- GUIMARÃES, D., Momesso, L., & Pupo, M. (2010). Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Química Nova, 33*, 667–679.
- HEDHILI, L., Romdhane, M., Planche, H., & Abderrabba, M. (2005). Towards gas chromatography- mass spectrometry coupling protocols for both identifying and quantification essential oils of Thymus capitatus Hoff et Link. *Journal of Chromatography A, 1064*, 129–134.
- HOPKINSON, S. M. (1969). The Chemistry and Biochemistry of Phenolic Glycosides. *Quarterly Reviews, Chemical Society, 23*, 98–124.
- HUDAIB, M., Speroni, E., Pietra, A. M. Di, & Cavrini, V. (2002). GC/MS evaluation of thyme (Thymus vulgaris L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 29*, 691–700.
- JARDIM BOTÂNICO. (2018a). UTAD. Ficha técnica da espécie Origanum vulgare subesp. vulgare. Retrieved February 3, 2018, from [https://jb.utad.pt/especie/Origanum\\_vulgare\\_subesp\\_vulgare](https://jb.utad.pt/especie/Origanum_vulgare_subesp_vulgare)
- JARDIM BOTÂNICO. (2018b). UTAD. Ficha técnica da espécie Thymus mastichina. Retrieved February 3, 2018, from [https://jb.utad.pt/especie/Thymus\\_mastichina](https://jb.utad.pt/especie/Thymus_mastichina)
- JORDÁN, M. J., Martínez, R. M., Goodner, K. L., Baldwin, E. A., & Sotomayor, J. A. (2006). Seasonal variation of Thymus hyemalis Lange and Spanish Thymus vulgaris L. essential oils composition. *Industrial Crops & Products, 24*, 253–263.
- KLOUS, G., Huss, A., Heederik, D. J. J., & Coutinho, R. A. (2016). Human – livestock contacts and their relationship to transmission of zoonotic pathogens, a systematic review of literature. *One Health, 2*, 65–76.
- KULISIC, T., Radonic, A., Katalinic, V., & Milos, M. (2004). Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chemistry, 85*, 633–640.
- LAMBERT, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., & Nychas, G. E. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal*



- of Applied Microbiology*, 91, 453–462.
- LANGE, D. (2004). Medicinal and Aromatic Plants: Trade, Production, and Management of Botanical Resources. *Acta Horticulturae*, 629, 177–197.
- LOPES-LUTZ, D., Alviano, D. S., Alviano, C. S., & Kolodziejczyk, P. P. (2008). Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of Artemisia essential oils. *Phytochemistry Reviews*, 69, 1732–1738.
- LUBBE, A., & Verpoorte, R. (2011). Cultivation of medicinal and aromatic plants for specialty industrial materials. *Industrial Crops & Products*, 34, 785–801.
- MARTINS, A. P., Nogueira, M. T., Costa, M. do C., & Salgueiro, L. (2012). Requisitos de qualidade em óleos essenciais: A importância das monografias da Farmacopeia Europeia e das normas ISO. *Revista de Fitoterapia*, 11, 131–132.
- MIGUEL, M. G., Falcato-Simões, M., Figueiredo, A. C., Barroso, J. M. G., Pedro, L. G., & Carvalho, L. M. (2005). Evaluation of the Antioxidant Activity of Thymbra capitata, Thymus mastichina and Thymus camphorayus Essential Oils. *Journal of Food Lipids*, 12, 181–197.
- MOCKUTE, D., Bernotiene, G., & Judzentiene, A. (2001). The essential oil of Origanum vulgare L. ssp. vulgare growing wild in Vilnius district (Lithuania). *Phytochemistry Reviews*, 57, 65–69.
- NGIONI, A. L. A., Arra, A. N. B., Oroneo, V. A. C., Tossicologia, D., Ospedale, V., Sanita, D., & Porcell, V. (2006). Chemical Composition, Seasonal Variability, and Antifungal Activity of Lavandula stoechas L. ssp. stoechas Essential Oils from Stem/Leaves and Flowers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4364–4370.
- NICKAVAR, B., Mojab, F., & Dolat-Abadi, R. (2005). Analysis of the essential oils of two Thymus species from Iran. *Food Chemistry*, 90, 609–611.
- NIST. (2018). National Institute of Standards and Technology. Retrieved January 9, 2018, from <https://webbook.nist.gov>
- NOSTRO, A., & Papalia, T. (2012). Antimicrobial activity of carvacrol: current progress and future prospectives. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, 7, 28–35.
- OCHMAN, H., Lawrence, J. G., & Groisman, E. A. (2000). Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature*, 405, 299–304.
- OLSEN, R. H., Christensen, H., Kabell, S., & Bisgaard, M. (2018). Characterization of prevalent bacterial

- pathogens associated with pododermatitis in table egg layers. *Avian Pathology*, 47, 281–285.
- ÖZCAN M., & Chalchat, J.-C. (2004). Aroma Profile of *Thymus vulgaris* L. Growing Wild in Turkey. *Bulg. J. Plant Physiol*, 30, 68–73.
- PÉRINO-ISSARTIER, S., Ginies, C., Cravotto, G., & Chemat, F. (2013). A comparison of essential oils obtained from lavandin via different extraction processes: Ultrasound, microwave, turbohydrodistillation, steam and hydrodistillation. *Journal of Chromatography A*, 1305, 41–47.
- PETER, K. V. (2012). *Handbook of herbs and spices* (2nd ed.). Tamil Nadu: Woodhead Publishing.
- PIRES, P., & Delgado, F. (2013). Orégão-Vulgar (*Origanum vulgare* L.): uma revisão. *Agroforum*, 17–21.
- PRAZERES, E. (2004). *Salmonelose Aviária*. Universidade Tuiuti do Paraná.
- RADUŠIENĖ, J., Ivanauskas, L., Janulis, V., & Jakstas, V. (2008). Composition and variability of phenolic compounds in *Origanum vulgare* from Lithuania. *Biologija*, 54, 45–49.
- RAUHA, J.-P., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kähkönen, M., Kujala, T., Kahkonen, M. (2000). Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 56, 3–12.
- RITSEMA, T., & Smeekens, S. (2003). Fructans: Beneficial for plants and humans. *Current Opinion in Plant Biology*, 6, 223–230.
- RODRIGUES, V. R. F. (2014). *Avaliação da atividade anti-inflamatória do óleo essencial de Thymus zygis subsp. sylvestris e dos seus compostos principais*. Universidade de Coimbra.
- RONQUILLO, M. G., Carlos, J., & Hernadez, A. (2016). Antibiotic and synthetic growth promoters in animal diets: Review of impact and analytical methods. *Food Control*, 72, 255–267.
- RUIZ, A. (2015). *Characterisation and antioxidant and antienzymatic bioactivities of essential oils of lavender, thyme and oregano from Murcia*. Universidad de Murcia.
- RUSSO, M., Galletti, G. C., Bocchini, P., & Carnacini, A. (1998). Essential Oil Chemical Composition of Wild Populations of Italian Oregano Spice (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart): A Preliminary Evaluation of Their Use in Chemotaxonomy by Cluster Analysis . 1 . Inflorescences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3741–3746.
- SAHIN, F., Gulluce, M., Daferera, D., Sokmen, A., Polissiou, M., Agar, G., & Ozer, H. (2004). Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control*, 15, 549–557.

- SAIDENBERG, A. B., & Knobl, T. (2005). Colibacilose em aves silvestres. *Ciência Veterinária Nos Trópicos*, 8, 16–28.
- SALVADOR, Â. C., Baptista, I., Barros, A. S., Gomes, N. C. M., Cunha, Â., Almeida, A., & Rocha, S. M. (2013). Can volatile organic metabolites be used to simultaneously assess microbial and mite contamination level in cereal grains and coffee beans? *PLOS ONES*, 8, 1–13.
- SANTOS, M. R. M. dos. (2010). *Composição terpénica e actividade anti-oxidante de plantas e infusões*. Universidade de Aveiro.
- SANTURIO, D. F., Maboni, G., Cavalheiro, C. P., Pozzo, M. D., Alves, S. H., Lucy, L., & Fries, M. (2011). Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a amostras de *Escherichia coli* isoladas de aves e bovinos. *Ciência Rural*, 41, 1051–1056.
- SHAABAN, H., El-Ghorab, A., & Shibamoto, T. (2012). Bioactivity of essential oils and their volatile aroma components: Review. *The Journal Of Essential Oil Research*, 24, 203–212.
- SHAN, B., Cai, Y., Sun, M., & Corke, H. (2005). Antioxidant Capacity of 26 Spice Extracts and Characterization of Their Phenolic Constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 7749–7759.
- SHIVAPRASAD, H. L. (2000). Fowl typhoid and pullorum disease. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 19, 405–424.
- SILVA, J., Duarte-Almeida, J., Perez, D., & Franco, B. (2010). Oregano essential oil: influence of the chemical composition on the inhibitory activity against *Salmonella Enteritidis*. *Ciência E Tecnologia de Alimentos*, 30, 136–141.
- SILVA, J. P., Duarte-Almeida, J. M., Perez, D. V., & Franco, B. (2010). Oregano essential oil: influence of the chemical composition on the inhibitory activity against *Salmonella Enteritidis*. *Ciência E Tecnologia de Alimentos*, 30, 136–141.
- SILVA, S. D. J. da. (2014). *Caracterização química dos extratos aquosos e hidro-etanólicos de Tomilho vulgar (Thymus vulgaris L.), Tomilho bela-luz (Thymus mastichina L.) e Tomilho limão (Thymus x citriodorus L.) e avaliação da sua toxicidade usando modelos in vitro*. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.
- SMITH-PALMER, A., Stewart, J., & Fyfe, L. (1998). Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 26, 118–122.

- SORIANO, M. C., Sotomayor, J. A., Correal, E., Gomez, P. S., & García-Vallejo, C. (1997). Chemical composition of the essential oil of thymus x arundanus wilk. and its parents T. mastichina L. and T. baeticus Boiss ex Lacaita. *Journal of Essential Oil Research*, 9, 275–280.
- SOUSA, C. M. D. M., Rocha, H., Vieira-jr, G. M., Ayres, M. C. C., Costa, L. S., Araújo, D. S., Brandão, M. S. (2007). Fenóis Totais e Atividade Antioxidante de Cinco Plantas Medicinais. *Química Nova*, 30, 351–355.
- TEIXEIRA, B., Marques, A., Ramos, C., Serrano, C., Matos, O., Neng, N. R., Nunes, M. L. (2013). Chemical composition and bioactivity of different oregano (*Origanum vulgare*) extracts and essential oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 2707–2714.
- TEUBER, M. (2001). Veterinary use and antibiotic resistance. *Current Opinion in Microbiology*, 4, 493–499.
- UGALDE, M. L., Cezaro, A. M. De, Cenci, A., Júnior, C. V., Paroul, N., Toniazzo, G., Cansian, R. L. (2016). Actividad Antibacteriana y Antioxidante de los Aceites Esenciales Comerciales de Romero, Clavo de Olor, Orégano y Salvia. *Revista de Ciencia Y Tecnologia*, 54–60.
- UNITED NATIONS. (2018a). Food and Agriculture Organization. Retrieved January 25, 2018, from <http://www.fao.org>
- UNITED NATIONS. (2018b). Sustainable Development. Retrieved May 5, 2018, from <https://sustainabledevelopment.un.org/>
- VENSKUTONIS, P. R. (1997). Effect of drying on the volatile constituents of thyme (*Thymus vulgaris* L.) and sage (*Salvia officinalis* L.). *Food Chemistry*, 59, 219–227.
- VIAN, M., Fernandez, X., Visinoni, F., & Chemat, F. (2008). Microwave hydrodiffusion and gravity, a new technique for extraction of essential oils. *Journal of Chromatography A*, 1190, 14–17.
- VIEIRA, D. A. de P., & Fernandes, N. C. de A. Q. (2012). *Microbiologia Geral. Ministério da Educação*. Santa Maria: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia.
- VISEK, W. J. (1978). The Mode of Growth Promotion by Antibiotics. *Journal of Animal Science*, 46, 1447–1469.
- VORAGEN, A. G. J., Coenen, G. J., Verhoef, R. P., & Schols, H. A. (2009). Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Structural Chemistry*, 20, 263–275.
- WILLEY, J. M., Sherwood, L. M., & Woolverton, C. J. (2008). *Prescott, Harley, and Klein's*

*Microbiology*. (McGraw-Hill, Ed.) (7th ed.). New York: Colin Wheatley/Janice Roerig-Blong.

WINK, M. (2010). *Biochemistry of Plant Secondary Metabolites* (2nd ed., Vol. 40). United Kingdom: Blackwell Publishing Ltd.

WOJDYLO, A., Oszmianski, J., & Czemerzys, R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, 105, 940–949.