



Avaliação da composição química, atividade antioxidante e atividade antimicrobiana de Segurelha (*Satureja montana*)

Lina Maria Pires Cancela Madureira

*Dissertação apresentada à Escola Superior de Tecnologia e Gestão
para obtenção do grau de Mestre em Tecnologia Biomédica*

Orientado por:

Prof^ª. Doutora Joana Andréa Soares Amaral

Prof^ª. Doutora Ana Maria Alves Queiroz da Silva

Bragança, 2020

Ao meu marido

Ao meu filho

Aos meus pais

Ao meu irmão

Agradecimentos

A concretização das várias etapas da nossa vida e resultado não é só do nosso empenho mas também do apoio, generosidade, disponibilidade e colaboração de todas as pessoas que nos rodeiam no dia-a-dia. Por isso não podia deixar de agradecer a algumas pessoas que contribuíram, de forma direta ou indireta, para a realização de mais uma etapa importante da minha vida. Assim gostaria de exprimir algumas palavras de agradecimento e profundo reconhecimento, em particular:

À Professora Doutora Joana Amaral, muito obrigado pela sua orientação, dedicação, disponibilidade, paciência e ensinamento disponibilizado ao longo destes meses.

À professora Doutora Ana Maria Queiroz pelo apoio e ajuda que sempre me disponibilizou.

Queria também agradecer à Engenheira Maria João Afonso, do laboratório de processos químicos (LPQ), pela disponibilidade, conhecimentos partilhados e apoio durante o tempo de realização deste trabalho.

Aos meus pais, irmão e restante família, um especial obrigado por acreditarem em mim e sempre me incentivarem a nunca desistir das minhas ambições pessoais.

Ao meu marido, Bruno Madureira, pelo amor, partilha, companheirismo e apoio incondicional, agradeço a enorme compreensão, generosidade e alegria com que me brindou constantemente, contribuindo para chegar ao fim deste percurso. Sem ele, nem sempre o nosso Gabriel me deixaria pensar. E claro, ao meu querido filho, Gabriel, que amo incondicionalmente e que veio dar um novo colorido à minha vida, espero doravante compensá-lo das horas de atenção e brincadeira que lhe devo. Foi ele o meu grande estímulo nesta caminhada.

Um muito obrigado aos meus amigos por me transmitirem a força e apoio nos momentos menos fáceis deste percurso, por caminharem a meu lado e por todos os momentos passados ao longo destes anos.

A todos vocês, um obrigado de coração por fazerem de mim o que sou hoje.

Índice

ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
ÍNDICE DE TABELAS.....	vi
ABREVIATURAS.....	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 <i>Satureja montana</i> : descrição botânica	3
2.2 Óleos essenciais.....	4
2.2.1 Terpenos.....	5
2.2.2 Óleos essenciais da <i>Satureja montana</i>	6
2.2.3 Métodos de extração.....	7
2.2.3.1 Hidrodestilação.....	7
2.2.3.2 Extração com solventes orgânicos	8
2.3 Atividade antioxidante.....	10
2.3.1 Compostos fenólicos	10
2.3.2 Flavonoides	12
2.3.3 Ensaio de avaliação da capacidade antioxidante	13
2.3.3.1 Captação de radicais DPPH	13
2.3.3.2 Ensaio de poder redutor	14
2.3.3.3 Ensaio da inibição da descoloração do β -caroteno.....	14
2.3.4 Atividade antimicrobiana.....	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.1 Padrões e reagentes	17
3.2 Determinação dos compostos bioativos.....	17
3.2.1 Obtenção e preparação das amostras.....	17
3.2.2 Extração do óleo essencial da amostra	18
3.2.3 Preparação dos extratos.....	19
3.3 Determinação da composição química	20
3.3.1 Compostos voláteis	20
3.3.2 Compostos fenólicos totais.....	20
3.3.3 Flavonoides totais	22
3.4 Determinação da atividade antioxidante.....	23
3.4.1 Captação do radical DPPH.....	23
3.4.2 Poder redutor.....	24
3.4.3 Inibição da descoloração do β -caroteno	25
3.5 Determinação da atividade antimicrobiana.....	25
3.5.1 Método da difusão em placas de agar.....	26
3.5.2 Método da macrodiluição	27
3.5.3 Método da microdiluição	28
3.6 Preparação e avaliação de hidrogéis	29
4. RESULTADOS E DISCUSÃO	30
4.1 Composição química	30
4.1.1 Quantificação e identificação dos compostos do óleo essencial da <i>Segurelha</i>	30
4.1.2 Teor total de fenóis e de flavonoides.....	35
4.2 Bioatividade	38

4.2.1	Atividade antioxidante.....	38
4.2.2	Atividade antimicrobiana.....	42
4.3	Incorporação do extrato no hidrogel.....	47
5.	CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS.....	53
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Aspetto geral de Satureja montana, folhas secas (esquerda) e espécie vegetal (direita).</i> ...	3
Figura 2. <i>Estruturas químicas dos compostos majoritários presentes no óleo essencial de Satureja montana, Timol (esquerda) e Carvacrol (direita).</i>	7
Figura 3. <i>Esquema do aparelho Clevenger para extração (Fonte: Núcleo de Pesquisa de Plantas Mediciniais, 2011).</i>	8
Figura 4. <i>Aparelho de Soxhlet para extração por solvente (Fonte: Revista do Instituto Geológico, 2010).</i>	9
Figura 5. <i>Estrutura base dos flavonoides (Fonte: Costa et al., 2009).</i>	12
Figura 6. <i>Esquema representativo do radical DPPH na presença de uma amostra com capacidade de captação do radical (Fonte: Adaptado de Molyneux et al., 2004).</i>	14
Figura 7. <i>Aparelho de Clevenger para a realização da hidrodestilação e uma amostra de óleo essencial extraído de Segurelha seca guardado num frasco de vidro.</i>	18
Figura 8. <i>Evaporador rotativo, (Buchi), utilizado na preparação de extratos.</i>	19
Figura 9. <i>Padrões preparados com ácido gálgico para a determinação dos fenóis totais.</i>	21
Figura 10. <i>Padrões preparados com catequina para a determinação dos flavonoides totais.</i>	22
Figura 11. <i>Determinação da % de captação do radical DPPH para o extrato hidroetanólico.</i>	23
Figura 12. <i>Fotografia da determinação do poder redutor da solução padrão de Trolox.</i>	24
Figura 13. <i>Método da difusão em placas com a bactéria Enterobacter, usando o óleo comercial (COM) e o óleo extraído em laboratório (Clev).</i>	26
Figura 14. <i>Diluições feitas para a avaliação da atividade antimicrobiana (esquerda) e crescimento após 24h na estufa para determinação da MBC (direita).</i>	28
Figura 15. <i>Método da microdiluição com a bactéria Proteus mirabilis.</i>	29
Figura 16. <i>Cromatograma obtido por GC-MS do óleo essencial comercial e respetiva ampliação. Os picos majoritários encontram-se numerados conforme apresentado na Tabela 1 (p-cimeno (11); limoneno (12); linalol (19); timol (32)).</i>	32
Figura 17. <i>Cromatograma obtido por GC-MS para o óleo essencial extraído por Clevenger. Os picos majoritários encontram-se numerados conforme apresentado na Tabela 1, (carvacrol (33); p-cimeno (11); γ-terpineno (15); β-cariofileno (40)).</i>	33
Figura 18. <i>Curva de calibração para a determinação de fenóis totais (em cima obtida através da realização da leitura no leitor de microplacas e em baixo no espectrofotómetro).</i>	36
Figura 19. <i>Curva de calibração para a determinação de flavonoides totais.</i>	37
Figura 20. <i>Percentagem de inibição do radical DPPH de diferentes concentrações de extrato aquoso e extrato hidroetanólico de Satureja montana.</i>	40
Figura 21. <i>Resultado da avaliação do poder redutor para diferentes concentrações de extrato aquoso e hidroetanólico de Satureja montana.</i>	41
Figura 22. <i>Imagem dos géis hidrossolúveis preparados.</i>	47
Figura 23. <i>Resultados de absorvância obtidos para a determinação de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu.</i>	48

ÍNDICE DE TABELAS

<i>Tabela 1. Composição química (% abundância relativa) dos óleos essenciais extraídos das folhas e óleo comercial de Segurelha (média ± desvio padrão).</i>	30
<i>Tabela 2. Resultados de absorvância ($\lambda=765$ nm) obtidos na análise de compostos fenólicos totais para diferentes diluições da mesma amostra, sendo as leituras realizadas em diferentes equipamentos.</i>	36
<i>Tabela 3. Resultados de absorvância ($\lambda=510$ nm) obtidos na análise de flavonoides totais para diferentes diluições da mesma amostra, sendo as leituras realizadas em diferentes equipamentos.</i>	37
<i>Tabela 4. Determinação dos compostos fenólicos totais e flavonoides totais estudados nas amostras de Satureja montana.</i>	38
<i>Tabela 5. Resultados da atividade antioxidante (valores de EC50, mg/mL) determinada pelos diferentes métodos.</i>	39
<i>Tabela 6. Diâmetros da zona de inibição (mm) obtidos nos ensaios de atividade antimicrobiana face a distintos microrganismos.</i>	43
<i>Tabela 7. Concentração mínima inibitória (MIC), bactericida (MBC) e fungicida (MFC, para C.albicans) dos óleos essenciais de Satureja montana (CLEV, Clevenger; OC, comercial).</i>	46
<i>Tabela 8. Resultados da atividade antioxidante (valores de EC50, mg de extrato/mL hidrogel) determinada pelos diferentes métodos.</i>	49
<i>Tabela 9. Resultados da avaliação da atividade antimicrobiana ($\mu\text{g/mL}$) dos hidrogéis adicionados de extrato hidroetanólico e decocção de Segurelha e dos compostos usados como controlo positivo.</i>	52

ABREVIATURAS

ARC	Atividade captadora de radicais livres
CG-MS	Cromatografia gasosa-espetrometria massas
CLEV	Clevenger
CLSI	Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (Clinical & Laboratory Standards Institute)
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EC50	Concentração de extrato correspondente a 50% de atividade antioxidante
ECat	Equivalentes de catequina
HidroEt	Extrato hidroetanólico
LRI^a	Índice de retenção linear teórico
LRI^b	Índice de retenção linear calculado
MBC	Concentração mínima bactericida (<i>Minimum Bactericidal concentration</i>)
MFC	Concentração mínima fungicida
MHB	Caldo Muller-Hinton
MIC	Concentração mínima inibitória (<i>Minimum inhibitory concentration</i>)
NA	Ágar nutritivo
NB	Caldo nutritivo
OC	Óleo comercial
OE	Óleo essencial
RT	Tempo de retenção
SI	Sem inibição
TIC	Corrente total de iões
UFC	Unidades formadoras de colónias

RESUMO

Nos últimos anos tem vindo a aumentar o interesse pelos produtos naturais, como é o caso das plantas medicinais e aromáticas, devido ao seu amplo espectro de ação na indústria alimentar, cosmética e farmacêutica e na medicina popular. As plantas aromáticas e de uso medicinal são utilizadas pelo Homem desde a antiguidade devido às suas propriedades terapêuticas. A partir destas plantas obtêm-se óleos essenciais, cujas atividades antimicrobiana e antioxidante estão descritas em inúmeros trabalhos. Estas propriedades têm adquirido destaque nas últimas décadas devido ao aumento da resistência bacteriana aos antibióticos disponíveis no mercado e à toxicidade apresentada pelos antioxidantes sintéticos.

A Segurelha (*Satureja montana*), incluída botanicamente na família *Lamiaceae*, é uma planta aromática frequentemente usada como tempero, estando também referido o seu uso na medicina tradicional. Tal deve-se a propriedades tais como anti-inflamatória, analgésica, antidiabética, anti-hipercolesterolémica, entre outras, as quais podem estar associadas a vários compostos, principalmente os presentes nos óleos essenciais os quais possuem um forte caráter terpénico, geralmente fenólico.

Este trabalho pretendeu ser um contributo para um melhor conhecimento da composição química e bioatividade da planta aromática *Satureja montana*, tendo-se estudado o óleo essencial e diferentes extratos polares. No que respeita à fração apolar, foi estudada a composição química por GC-MS de uma amostra de óleo essencial extraída por sistema Clevenger e de uma amostra comercial. Para ambas, procedeu-se à avaliação da atividade antimicrobiana pelo método da macrodiluição em caldo. Foram preparados dois extratos (hidroetanólico e decocção) e avaliados quanto ao teor total de compostos fenólicos, de flavonoides e atividade antioxidante por três métodos distintos. Os extratos foram ainda incorporados em hidrogéis, os quais foram avaliados quanto às suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas.

Verificou-se a ocorrência de teores superiores de fenóis totais e flavonoides no extrato decocção comparativamente ao extrato hidroetanólico, bem como superior capacidade antioxidante do extrato hidroetanólico, expressa em capacidade captadora do radical DPPH, poder redutor e inibição da descoloração do β -caroteno. No que respeita à atividade antimicrobiana, ambos os óleos essenciais apresentaram atividade bactericida face a todos os microrganismos estudados, tendo o óleo extraído em Clevenger demonstrado melhores resultados. Os hidrogéis preparados com a incorporação de extrato hidroetanólico e decocção demonstraram atividade antioxidante e antimicrobiana, sugerindo que a utilização destes

extratos pode ser uma potencial alternativa a antioxidantes e/ou conservantes sintéticos neste tipo de produtos.

Conclui-se, desta forma, que a Segurelha pode ser uma potencial fonte de antimicrobianos e antioxidantes naturais de interesse para diferentes indústrias.

Palavras-chave: plantas aromáticas, *Satureja montana*, fenóis totais, flavonoides, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana, hidrogéis.

ABSTRACT

In recent years, interest in natural products has increased, such as medicinal and aromatic plants, due to their wide range of action in the food, cosmetic and pharmaceutical industry and in popular medicine.

Aromatic and medicinal plants have been used by man since ancient times due to their therapeutic properties. Essential oils are obtained from these plants, whose antimicrobial and antioxidant activities are described in numerous studies. These properties have gained prominence in recent decades due to the increase in bacterial resistance to antibiotics available on the market and the toxicity presented by synthetic antioxidants.

Segurelha (*Satureja montana*), botanically included in the *Lamiaceae* family, is an aromatic plant often used as a spice, and its use in traditional medicine is also mentioned. This is due to properties such as anti-inflammatory, analgesic, anti-diabetic, anti-hypercholesterolemic, among others, which can be associated with several compounds, mainly those present in essential oils that have a strong terpenic character, generally phenolic. This work intended to be a contribution to a better knowledge of the chemical composition and bioactivity of the aromatic plant *Satureja montana*, having studied the essential oil and different polar extracts. Regarding the nonpolar fraction, the chemical composition was studied by GC-MS of a sample of essential oil extracted by Clevenger system and a commercial sample. For both, the antimicrobial activity was evaluated using the broth macrodilution method. Two extracts were prepared (hydroethanolic and decoction) and evaluated for the total content of phenolic compounds, flavonoids and antioxidant activity by three different methods. The extracts were also incorporated into hydrogels, which were evaluated for their antioxidant and antimicrobial properties.

Higher levels of total phenols and flavonoid were found in the decoction extract compared to the hydroethanolic extract, as well as the superior antioxidant capacity of the hydroethanolic extract, expressed in the capacity to capture the DPPH radical, reducing power and inhibition of β -carotene discoloration. With regard to antimicrobial activity, both essential oils showed bactericidal activity in relation to all the microorganisms studied, with the oil extracted in Clevenger showing better results. Hydrogels prepared with the incorporation of hydroethanolic extract and decoction showed antioxidant and antimicrobial activity, suggesting that the use of these extracts may be a potential alternative to antioxidants and/or synthetic preservatives in this type of products.

It is concluded, therefore, that Segurelha can be a potential source of antimicrobials and natural antioxidants of interest to different industries.

Keywords: aromatic, *Satureja montana*, total phenols, flavonoids, antioxidant activity, antimicrobial activity, hydrogels.

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Desde tempos muito remotos que o Homem aprendeu a utilizar as plantas para seu proveito e muitos povos ou civilizações foram armazenando um vasto conhecimento acerca de como usar muitas e variadas plantas. O Homem aprendeu a usar e manipular diversas plantas que possuem poderes curativos, tendo muitas delas desempenhado um importante papel no desenvolvimento da Medicina ao longo de vários séculos. Se por um lado o conhecimento sobre as plantas e suas virtudes levaram à sua investigação científica e, por conseguinte, permitiram o avanço da Medicina, por outro lado foi no seio das comunidades rurais e dos povos indígenas que se estabeleceu a mais íntima relação Homem-Planta, relação esta muitas vezes fulcral para o desenvolvimento das populações e para a sobrevivência individual. Se bem que no passado a medicina popular fosse muito comum e desempenhasse para muitas populações a única forma de acesso à medicina, hoje em dia, nas sociedades ditas mais desenvolvidas, é relativamente fácil o acesso à chamada Medicina Convencional e a muitos e variados fármacos. Assim, a medicina popular tende a representar, cada vez mais, um papel secundário, principalmente nas sociedades mais desenvolvidas (Camejo, 2001).

Em Portugal existe ainda um vasto manancial de conhecimentos acerca dos usos populares e tradicionais das plantas. No entanto, a utilização das plantas em remédios caseiros é uma prática que vai diminuindo de intensidade e importância, mesmo nas comunidades rurais. Atualmente, as gerações mais novas já não sentem necessidade de recorrer ao uso das plantas consideradas e usadas tradicionalmente como medicinais, pelo que não se desenvolve interesse em aprender os seus usos populares. Assim sendo, estes saberes tradicionais (que são parte integrante de um povo) tornam-se cada vez mais relíquias e persistem quase exclusivamente nas pessoas mais antigas, tendendo a desaparecer com o tempo, ou mesmo a extinguir-se a médio prazo, caso nada se faça para o impedir (Rodrigues, 2002).

Designam-se aromáticas as plantas que apresentam aroma ou perfume, geralmente agradável, que é proporcionado pelos óleos essenciais biossintetizados pela planta e armazenados em estruturas específicas (Cunha *et al.*, 2012). Os óleos essenciais são extraídos geralmente por processos físicos de destilação e apresentam uma composição complexa de metabolitos lipófilos secundários que se caracterizam pela sua elevada

volatilidade, sendo muitas vezes designados de óleos voláteis. Estes compostos são insolúveis em água, mas solúveis em óleos e solventes orgânicos. Na sua composição química destacam-se os terpenos que derivam da via do ácido mevalónico, e os fenilpropanóides, produtos obtidos pela via do chiquimato. Na maioria dos casos, associa-se a atividade do óleo essencial ao seu composto ativo maioritário. No entanto, não se deve descurar o efeito sinérgico entre os vários fitoquímicos (Cunha *et al.*, 2012). Todas as plantas produzem compostos através do seu metabolismo que são imprescindíveis para garantir a sobrevivência, podendo estes ser distinguidos em metabolitos primários (comuns a todos os seres vivos) nomeadamente, lípidos, hidratos de carbono e proteínas; e metabolitos secundários (específicos de cada organismo e derivados dos primários) como sejam os terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados que são derivados de diversas vias metabólicas (Engelberth, 2010, Souza *et al.*, 2010).

O uso de óleos essenciais encontra-se largamente descrito no que diz respeito a cosméticos e perfumaria, apesar da composição destes óleos ser complexa. Por outro lado, a utilização de plantas medicinais e aromáticas contendo óleos essenciais na medicina tradicional é sobejamente conhecida. Desta forma, surge a necessidade da realização de estudos que permitam uma melhor compreensão das suas propriedades químicas e biológicas, como também dos seus componentes individuais, por forma a validar a sua utilização. Estes estudos podem igualmente contribuir para o desenvolvimento de novas aplicações destes produtos na saúde humana, cosmética, agricultura e/ou meio ambiente.

Desta forma, este trabalho teve como objetivo principal contribuir para o conhecimento da composição química e bioatividade da planta aromática *Satureja montana*, comumente conhecida como Segurelha, sendo esta usada na alimentação e na medicina tradicional. Neste contexto pretendeu-se efetuar a extração de óleos essenciais das folhas de *Satureja montana*, a determinação da sua composição em compostos voláteis e a avaliação da sua atividade antimicrobiana. Foi ainda estudado um óleo essencial de Segurelha comercial e feita a sua comparação com o óleo essencial extraído das folhas da *Satureja montana*. Adicionalmente, foram preparados extratos com diferentes solventes, para os quais se procedeu à determinação do teor em compostos fenólicos totais, flavonóides totais e determinou-se a sua atividade antioxidante por meio de ensaios distintos. Por último, avaliou-se o potencial da utilização de extratos desta planta, contendo compostos fenólicos, em produtos cosméticos/dermofarmacêuticos, através da sua incorporação como ingrediente num hidrogel.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Satureja montana*: descrição botânica

O género *Satureja montana* compreende mais de 30 espécies cujos centros de distribuição estão localizados na porção oriental da região mediterrânica Europeia, Ásia ocidental, Norte de África, Ilhas Canárias e América do Sul (Slavikovska *et al.*, 2001; Azaz *et al.*, 2005). *Satureja montana* comumente conhecida como Segurelha de inverno ou Segurelha montanhosa (Figura 1), pertence à família *Lamiaceae*, subfamília *Nepetoideae*, tribo *Mentheae*. É uma planta perene semi-arbustiva (20-30 cm) que habita zonas áridas, ensolaradas e rochosas. É nativa da região mediterrânica, podendo ser encontrada por toda a Europa, Rússia e Turquia (Slavkovska *et al.*, 2001; Mastelić *et al.*, 2003; Bezbradica *et al.*, 2005; Četković *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2009). A Segurelha de inverno é uma erva aromática forte e tem sido usada há centenas de anos como condimento de alimentos e chás; é utilizada na comida mediterrânica, principalmente, como tempero de carnes e peixes (Prieto *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2009). Na medicina tradicional e homeopática, a Segurelha de inverno é utilizada como estimulante, expetorante, carminativo, anticatarral e afrodisíaco e para tratar várias enfermidades, principalmente digestivas, como cólicas e diarreia (Četković *et al.*, 2007). Estão ainda descritas diversas propriedades associadas a espécies do género *Satureja* tais como antioxidante, antisséptica, antidiabética, anti-hiperlipidémica e estimulante do sistema reprodutor (Momtaz *et al.*, 2010).



Figura 1. Aspeto geral de *Satureja montana*, folhas secas (esquerda) e espécie vegetal (direita).

2.2 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são misturas complexas de compostos de baixo peso molecular extraídos de plantas. Os seus constituintes, principalmente os terpenóides e fenilpropanóides, fornecem aromas e apresentam frequentemente atividade biológica (Burt, 2004). São insolúveis em água mas solúveis em solventes orgânicos apolares e gorduras, apresentando-se normalmente incolores ou amarelados (Prins *et al.*, 2006; Cunha *et al.*, 2009).

Os componentes dos óleos essenciais variam de acordo com o tipo de plantio, clima, períodos sazonais e estações do ano. O tipo de extração utilizada para remoção do óleo também influencia na concentração e quantidade dos componentes obtidos (Djilani *et al.*, 2012).

Com a extensa variedade de óleos essenciais, alguns têm sido mais estudados e cada vez mais utilizados na medicina alternativa. A procura por tratamentos alternativos vem crescendo ao longo dos anos devido a o aumento de pessoas imunocomprometidas, uso indiscriminado de fármacos, cancro, entre outras doenças, assim como a limitação de antibióticos disponíveis para terapia (Raut *et al.*, 2014).

Na natureza, estes óleos desempenham diversos papéis importantes na proteção das plantas, como agentes antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas, reduzindo o número de doenças ocasionadas por esses microrganismos presentes na natureza (Bakkali *et al.*, 2008). Além do fator de proteção eles podem atrair insetos e animais que ajudam na polinização e na dispersão das sementes da planta. São extraídos de plantas geralmente aromáticas presentes em zonas de clima temperado, por exemplo, em países tropicais e mediterrânicos onde representam grande conhecimento da medicina popular local (Bakkali *et al.*, 2008).

Os compostos que fazem parte dos óleos essenciais são geralmente extraídos de folhas e flores, variam de acordo com o tipo de planta e a parte da planta utilizada na extração, assim como do método de extração. Geralmente são usadas técnicas de hidrodestilação, destilação a vapor e extração por solventes (Cowan, 1999), sendo que a hidrodestilação é a mais comum. Neste método a extração dos compostos voláteis é realizada por arrastamento de vapor de água, seguida da condensação do vapor recorrendo a um condensador apropriado.

Após serem extraídos, os óleos essenciais devem ser analisados para identificação e quantificação dos seus componentes. Para tal, são empregadas técnicas cromatográficas,

como a cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS).

Na cromatografia em fase gasosa, a amostra injetada no cromatógrafo volatiliza, permitindo a separação e a identificação dos compostos individuais através do tempo de retenção relativo da amostra quando comparado com padrões. Quando acoplado um detector de massas, além da separação dos componentes, obtêm-se espectros de massas de cada pico, que podem ser comparados com os obtidos para padrões ou com espectros constantes na biblioteca do equipamento ou na literatura.

2.2.1 Terpenos

Os terpenos compõem a essência volátil de flores e dos óleos essenciais de ervas aromáticas e especiarias, pertencendo a uma classe de compostos naturais com propriedades biológicas funcionais e desejáveis. Podem-se encontrar em todas as partes das plantas superiores: sementes, flores, frutos, folhas, raízes e também se encontram em musgos, algas, microrganismos entre outras.

Os compostos deste tipo, em forma de óleos ou extratos, têm sido utilizados desde a antiguidade como ingredientes de aromas, conservantes, perfumes, medicamentos, sabões e pigmentos. Os terpenos ou terpenóides podem ser classificados de acordo com o número de unidades isoprénicas que os constituem: monoterpenóides, sesquiterpenóides, diterpenóides, triterpenóides, tetraterpenóides e politerpenóides (Oliveira *et al.*, 2003).

Terpenos que contêm duas unidades de isopreno são chamados de monoterpenos (C₁₀), os quais são constituintes de componentes de essências voláteis de flores e óleos essenciais extraídos de plantas medicinais e ervas aromáticas, justificando a sua importância para a indústria de perfumes e aromatizantes (Croteau *et al.*, 2000).

Os sesquiterpenos (C₁₅) são os terpenos que derivam de três unidades de isopreno e, portanto, contêm quinze carbonos. Estes também são encontrados em óleos essenciais e vários deles atuam como fitoalexinas, compostos antimicrobianos produzidos em resposta a ataque de microrganismos. O grupo dos diterpenos (C₂₀) contém 20 carbonos e inclui resinas ácidas apresentadas por coníferas e leguminosas, fitoalexinas, e metabolitos secundários farmacologicamente importantes (como Taxol, quimioterápico, e forskolina) (Wildung *et al.*, 1996). Os triterpenos (C₃₀) apresentam 30 átomos de carbono e são sintetizados a partir da condensação cauda-cauda de duas unidades de sesquiterpeno pela extremidade fosfato.

Os terpenos que contêm oito unidades de isopreno são chamados tetraterpenos

(C40), sendo os principais deles os carotenoides, pigmentos intimamente ligados aos processos fotossintéticos. Terpenos que apresentam mais de oito unidades de isopreno são denominados politerpenos (terpenos com mais de 40 carbonos), onde se encontram compostos como ubiquinonas, poliprenoides e polímeros longos como a borracha encontrada no látex (Croteau *et al.*, 2000).

Os compostos terpênicos mais frequentes nos óleos voláteis são os monoterpenos, possuem grande variedade de estruturas com diversas funções como por exemplo antimicrobiana, hipotensora e anti-inflamatória.

Os monoterpenos são constituintes de componentes de essências voláteis de flores e óleos essenciais extraídos de plantas medicinais e ervas aromáticas, justificando sua importância para a indústria de perfumes e aromatizantes (Croteau *et al.*, 2000). Também são usados em preparações medicinais: por exemplo, a cânfora é utilizada para alívio da dor reumática e o timol e o carvacrol são usados em preparações bactericidas (Figura 2).

2.2.2 Óleos essenciais da *Satureja montana*

O óleo essencial de *Satureja montana* é utilizado na medicina tradicional popular, na indústria alimentícia, na dermatologia, entre outros.

A composição do óleo essencial de *Satureja montana* é variável dependendo da localização e estágio vegetativo da planta, método de extração e tratamento da erva antes da extração. De acordo com a maioria dos autores, os componentes mais abundantes são os compostos fenólicos timol e carvacrol, seguidos de monoterpenos como *p*-cimeno e γ -terpineno (Mastelic *et al.*, 2003; Radonic *et al.*, 2003; Skocibusic *et al.*, 2003; Prieto *et al.*, 2007; Cavar *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2009). Em contrapartida, Slavkoska *et al.*, (2011) encontraram como constituintes majoritários hidrocarbonetos monoterpênicos e sesquiterpênicos e álcoois.

Alguns autores, também relatam a presença de outros componentes presentes no óleo essencial de *Satureja montana* como cariofileno e geraniol (Sevarda *et al.*, 1986).

A atividade biológica e o uso dos óleos essenciais, nas diferentes indústrias, são dependentes da sua composição, a qual é afetada por diversos fatores. O efeito antioxidante do óleo essencial de *Satureja montana* tem sido relacionado com a presença de grupos hidroxilo nos seus compostos fenólicos (timol e carvacrol).

A atividade antimicrobiana do óleo é atribuída à presença de timol e carvacrol, uma vez que numerosos estudos evidenciam o poder bactericida destes compostos sobre

microrganismos patogénicos. Entretanto, os constituintes em menor concentração também devem ser considerados bem como a interação sinérgica entre eles, pois estes, afetam o efeito antimicrobiano dos óleos essenciais (Skocibusic *et al.*, 2003).

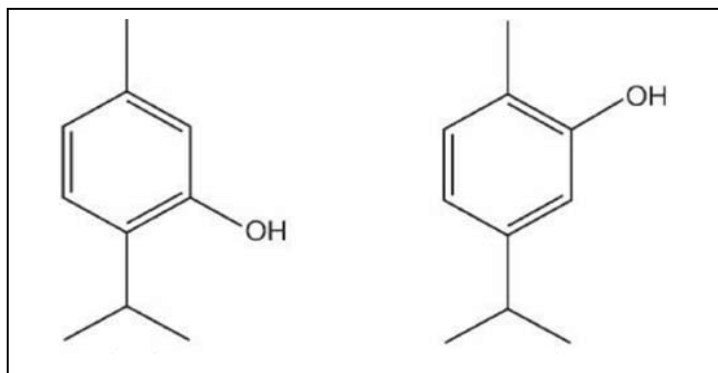


Figura 2. Estruturas químicas dos compostos maioritários presentes no óleo essencial de *Satureja montana*, Timol (esquerda) e Carvacrol (direita).

2.2.3 Métodos de extração

Os óleos essenciais podem ser extraídos das plantas em quantidade suficiente para serem utilizados em sínteses químicas ou como novos materiais, para uso científico ou comercial (Serafini *et al.*, 2002). Para tal, podem ser utilizados diferentes métodos de extração tais, como a hidrodestilação, a destilação a vapor, a extração por solventes orgânicos, a extração com fluídos supercríticos, entre outros.

A proporção de óleos essenciais extraídos por destilação a vapor é de 93%, enquanto os 7% restantes são extraídos utilizando os outros métodos (Yusoff *et al.*, 2011).

2.2.3.1 Hidrodestilação

A destilação é um processo de separação de misturas líquidas, baseado na diferença de composições dos constituintes nas fases líquidas e de vapor em equilíbrio, devido à diferença de volatilidade entre os componentes do líquido.

A extração de óleos essenciais por hidrodestilação pode ser efetuada por dois métodos, que são os seguintes: destilação do tipo Clevenger e destilação com arrastamento por vapor. Na destilação do tipo Clevenger a matriz a tratar é imersa em água. O aquecimento até à fervura provoca a formação de vapor que arrasta os compostos mais

voláteis. Após a condensação, estes compostos separam-se da água por decantação. Na destilação com arrastamento por vapor, o vapor de água atravessa a matriz arrastando os compostos voláteis, sendo a separação semelhante à destilação por Clevenger (Figura 3). Na destilação, o material é sujeito a temperaturas próximas dos 100 °C o que poderá levar à decomposição dos compostos termolábeis. Por outro lado, o aquecimento prolongado em contacto com a água poderá conduzir à hidrólise de ésteres, polimerização de aldeídos ou decomposição de outros compostos (Gil *et al.*, 2005).

Destes, o melhor método para extrair óleos essenciais a partir de plantas e ervas medicinais é a destilação por arrastamento com vapor de água (Figura 3).



Figura 3. Esquema do aparelho Clevenger para extração (Fonte: Núcleo de Pesquisa de Plantas Medicinais, 2011).

2.2.3.2 Extração com solventes orgânicos

A extração com solventes orgânicos apolares (hexano, éter etílico, éter de petróleo ou diclorometano) ou polares (acetato de etilo, metanol ou etanol) é outra técnica de extração utilizada para se obter o extrato bruto de plantas. A extração pode ser feita à temperatura ambiente ou a diferentes temperaturas com base na Temperatura de ebulição do solvente utilizado. Neste último caso, pode-se recorrer ao método de extração contínua de sólidos com solventes de baixo ponto de ebulição, que utiliza o extrator de Soxhlet em escala laboratorial, conforme se apresenta na Figura 4. Neste processo a amostra está sempre em contato com o solvente, havendo a constante renovação do solvente. Além disso, não há necessidade de filtração ao término da extração, a metodologia é simples e o

equipamento apresenta baixo custo (Luque *et al.*, 2010).

As maiores desvantagens da extração com Soxhlet em comparação a outras técnicas são o longo tempo necessário para a extração e a grande quantidade de solvente utilizado. A amostra geralmente é extraída no ponto de ebulição do solvente durante longos períodos. Além disso, para a recuperação do extrato há a necessidade de eliminação do solvente, que pode ser incompleta (Luque *et al.*, 2010).

A extração com solventes orgânicos é usada em todas as partes do mundo para obter maior rendimento ou produtos que não podem ser obtidos por nenhum outro processo.

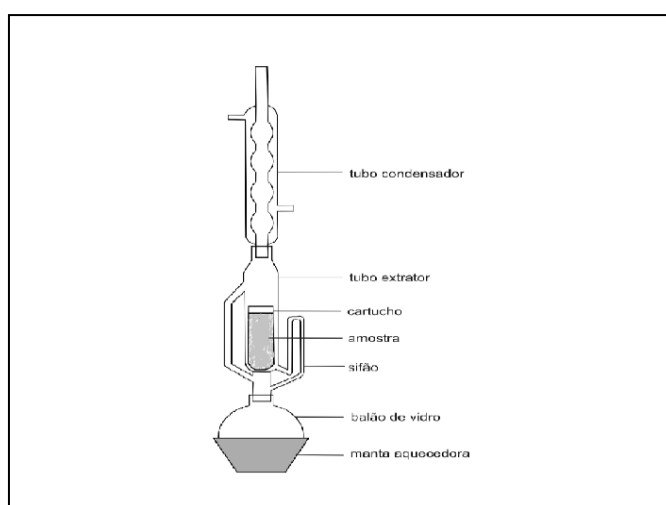


Figura 4. Aparelho de Soxhlet para extração por solvente (Fonte: Revista do Instituto Geológico, 2010).

Outra técnica muito utilizada na extração de compostos bioativos a partir de plantas é a extração sólido-líquido à temperatura ambiente (maceração) que consiste na separação de componentes solúveis, contidos numa matriz sólida, que se difundem no solvente quando este entra em contato direto com a matriz (Theodore *et al.*, 2010; Dutta, 2007; Ignat *et al.*, 2011). É uma operação unitária muito usada para recuperar diversos compostos ativos de plantas e das suas partes vegetais, bem como a preparação de extratos de origem vegetal, devido à sua fácil utilização (Ignat *et al.*, 2011; Dai *et al.*, 2010).

Neste processo existem diversos fatores que afetam a eficiência de extração e o seu rendimento, entre os quais, o tamanho das partículas e a presença de substâncias interferentes na matriz (Theodore *et al.*, 2010; Dutta, 2007). Assim, o material vegetal antes de ser submetido ao processo de extração é moído, triturado ou pulverizado para aumentar a área de superfície e promover uma boa mistura com o solvente. A toxicidade, a volatilidade, viscosidade e pureza do solvente de extração também influenciam a eficiência de extração (Bucar *et al.*, 2013).

A seleção do solvente depende da natureza dos compostos bioativos, sendo os mais usuais a água, os solventes orgânicos e misturas de solventes, entre os quais, metanol, etanol, acetato de etilo, acetona, diclorometano e hexano (Sasidharan *et al.*, 2011).

2.3 Atividade antioxidante

Um antioxidante pode ser definido como uma substância química que inibe o processo de oxidação, ou qualquer substância que, quando presente em baixa concentração, comparada à do substrato oxidável, diminui ou inibe significativamente a oxidação daquele substrato.

O consumo de antioxidantes naturais, como os compostos fenólicos presentes na maioria das plantas, que inibem a formação de radicais livres, também chamados de substâncias reativas, tem sido associado a uma menor incidência de doenças relacionadas com o stress oxidativo (Singh *et al.*, 2018). Já a vitamina E (α -tocoferol) consumida, é transportada na corrente sanguínea pelos componentes lipoproteicos e, em conjunto com as ubiquinonas, evitam a peroxidação lipídica. A vitamina C atua extinguindo o oxigênio singleto, também evitando a peroxidação lipídica e o β -caroteno atua na prevenção ou retardamento das reações oxidativas que, ao longo do tempo, conduzem ao desenvolvimento de doenças degenerativas (Chitarra *et al.*, 2005).

Os antioxidantes atuam em diferentes níveis na proteção dos organismos. O primeiro mecanismo de defesa contra os radicais livres é impedir a sua formação, principalmente pela inibição das reações em cadeia com o ferro e o cobre. Os antioxidantes são capazes de interceptar/neutralizar os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, impedindo o ataque sobre os lípidos, os aminoácidos das proteínas, a dupla ligação dos ácidos gordos poli-insaturados e as bases do DNA, evitando a formação de lesões e perda da integridade celular. Os antioxidantes obtidos da dieta, tais como as vitaminas C, E e A, os flavonoides e carotenóides são extremamente importantes na intercetação dos radicais livres.

2.3.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são produtos do metabolismo secundário que incluem uma grande diversidade de estruturas, simples e complexas, que possuem no mínimo um anel aromático, com um ou mais hidroxilos como grupos funcionais. Constituem um grupo

químico e funcionalmente heterogéneo, com aproximadamente 10.000 compostos conhecidos. Podem ser sintetizados por meio de duas vias bioquímicas: a via do ácido chiquímico e a via do acetato. A maioria dos compostos fenólicos secundários em plantas é derivada da fenilalanina (via do ácido chiquímico), através da eliminação de uma molécula de amónia para formar o ácido cinâmico. Em reações subsequentes, são adicionados grupos hidroxilo, e outros substituintes, dando origem a diversos compostos fenólicos simples, os fenilpropanóides. Estes são importantes unidades básicas para a formação de compostos fenólicos mais complexos, como os flavonoides, os taninos e a lignina (Salisbury *et al.*, 1994; Taiz *et al.*, 2004).

Os compostos fenólicos estão quase universalmente presentes nas plantas e acumulam-se em todas as partes dos vegetais (raiz, caule, folhas, flores e frutos), representam a classe de metabólitos secundários mais estudada. Entretanto a função de muitos compostos fenólicos é ainda desconhecida. Dentre as funções desempenhadas por esses compostos heterogéneos, pode-se citar as suas ações como pesticidas naturais, antibióticos, sinalizadores para o estabelecimento de relações de simbiose com microrganismos, atração de insetos polinizadores, proteção contra a radiação ultravioleta, além da função estrutural que dá estabilidade à planta (Heldt, 1997).

Os compostos fenólicos são considerados antioxidantes primários presentes nas plantas, e considera-se que há uma relação linear entre o conteúdo de compostos fenólicos totais e as propriedades antioxidantes de uma determinada espécie vegetal (Shylaja *et al.*, 2004).

Na quantificação de fenóis totais existem vários métodos que podem ser utilizados. Um dos métodos mais extensivamente utilizado é um método colorimétrico, que envolve a oxidação de fenóis em meio básico pelo reagente de Folin-Ciocalteu, de cor amarela. Este reagente consiste na mistura dos ácidos fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) e fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$). Da reação de oxidação resulta um composto de cor azul (molibdotungstofosfato), cuja absorção máxima é diretamente proporcional à composição quantitativa de compostos fenólicos na amostra analisada, sendo lida a absorvância a 765 nm (Ikawa *et al.*, 2003; Cicco *et al.*, 2009). A aplicação do método de Folin-Ciocalteu requer a realização de uma curva de calibração para a qual se usam diferentes concentrações de uma solução de ácido gálgico dissolvido em água e os resultados são apresentados em miligramas equivalentes de ácido gálgico por grama de extrato (Atoui *et al.*, 2005).

2.3.2 Flavonoides

Os flavonoides são a maior classe de compostos fenólicos presentes nas plantas, tendo sido identificados mais de quatro mil compostos dentro das principais classes (Wiseman, 2013). Estes compreendem um extenso grupo de substâncias que ocorrem naturalmente podendo ser encontrados em todas as partes de uma planta (Cassidy *et al.*, 2013). Estes fitoquímicos são também ubíquos nos frutos, vegetais, assim como em produtos alimentares, caso do azeite (Bakhouché *et al.*, 2013; Vinha *et al.*, 2005) e bebidas derivadas de plantas, como infusões (Friedman, 2007) e vinho tinto (Georgiev *et al.*, 2014).

Os flavonoides são moléculas de baixo peso molecular, consistindo em 15 átomos de carbono, organizados numa configuração de C₆-C₃-C₆. São compostos tricíclicos possuindo dois anéis aromáticos (anéis A e B), ligados por uma cadeia alifática de 3 carbonos, a qual normalmente se encontra condensada na forma de um pirano, o anel C (Figura 5) (Heim *et al.*, 2002; Peterson *et al.*, 1998). Segundo o grau de oxidação do anel C pode-se ter grupos diferentes de flavonóides, tais como os flavonóis, flavonas, flavanonas, entre outros. Apesar do nome flavonoides ter origem do latim “flavus”, que significa amarelo, os flavonoides geralmente são incolores e às vezes podem potenciar a coloração das plantas dentro da gama do verde até ao azul, sendo lida a absorvância a 510 nm.

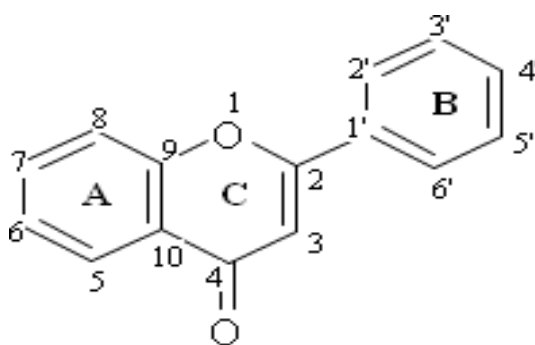


Figura 5. Estrutura base dos flavonoides (Fonte: Costa *et al.*, 2009).

Os flavonoides, ao contrário dos ácidos fenólicos, apresentam uma biossíntese mista: o anel aromático A, deriva da via acetato, enquanto os anéis B e C são sintetizados pela via chiquimato (Costa, 2009). São classificados em diferentes classes de compostos, de acordo com seu processo de formação: antocianinas, leucoantocianidinas, flavonóis, flavonas, flavanóis, chalconas, auronas, flavanonas e isoflavonas. Possuem propriedades químicas dos fenóis, sendo relativamente solúveis em água, principalmente quando possuem moléculas de açúcares ligadas à sua estrutura. São levemente ácidos e como são

compostos polares ou moderadamente polares, são solúveis em etanol, metanol e butanol e combinações de solventes com água. Podem sofrer degradação se deixados em meio alcalino na presença de oxigênio.

2.3.3 Ensaios de avaliação da capacidade antioxidante

2.3.3.1 Captação de radicais DPPH

O ensaio do DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) é um ensaio relativamente simples e rápido sendo um dos ensaios mais utilizados na determinação da capacidade antioxidante. Quando existe um elevado número de análises a realizar, podem ser utilizados leitores de microplacas (Karadag *et al.*, 2009). Apesar de ser um dos ensaios mais utilizados para a determinação e comparação do estado antioxidante de compostos fenólicos, a avaliação da capacidade antioxidante pelas alterações na absorvância do DPPH, devem ser avaliadas atentamente porque a absorvância do radical DPPH a 517 nm após a reação com um antioxidante diminui com a luz, com o oxigênio e com o tipo de solvente utilizado (Lee *et al.*, 2003; Karadag *et al.*, 2009).

O radical DPPH (que apresenta uma cor violeta forte), na presença de antioxidantes doadores de átomos de H, como é o caso dos fenóis, ou eletrões, é reduzido formando um produto amarelo (Figura 6), com conseqüente diminuição da absorvância. Quando existem compostos na solução que apresentam características antioxidantes esta coloração perde intensidade ou desaparece. O radical DPPH é convertido em hidrazina, de cor amarela pálida, resultando numa diminuição da absorvância entre 515 e 528 nm, até valores constantes (Magalhães *et al.*, 2008; Barreira, 2010; Barroso *et al.*, 2011).

A percentagem de atividade antioxidante corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade de antioxidante necessária para diminuir a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada concentração eficiente (EC50), ou seja quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua EC50 e maior a sua atividade antioxidante (Angelo *et al.*, 2007).

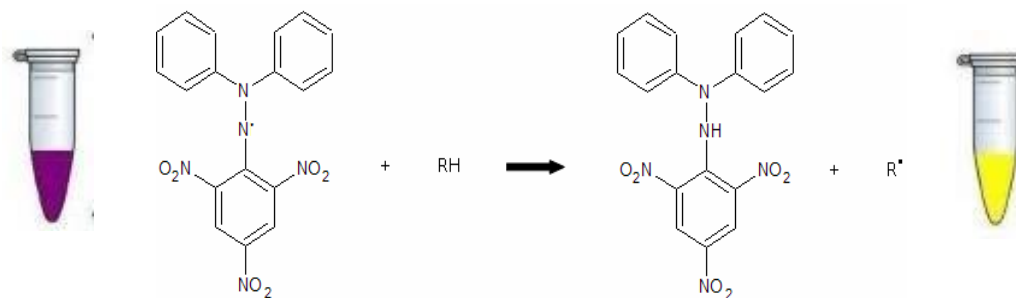


Figura 6. Esquema representativo do radical DPPH na presença de uma amostra com capacidade de captação do radical (Fonte: Adaptado de Molyneux *et al.*, 2004).

2.3.3.2 Ensaio de poder redutor

O método do poder redutor baseia-se na capacidade que os antioxidantes possuem em reduzir o íon férrico (Fe^{3+}) ($FeCl_3/K_3Fe(CN)_6$) à forma ferrosa (Fe^{2+}) (Chung *et al.*, 2002). Dependendo do poder redutor dos compostos avaliados, a cor amarela da solução altera para várias tonalidades de verde ou azul, podendo ser medida espectralmente a 690 nm (Yen *et al.*, 1995; Amarowicz *et al.*, 2004). A reação ocorre em meio ácido (pH = 3,6) para manter a solubilidade do ferro (Karadag *et al.*, 2009).

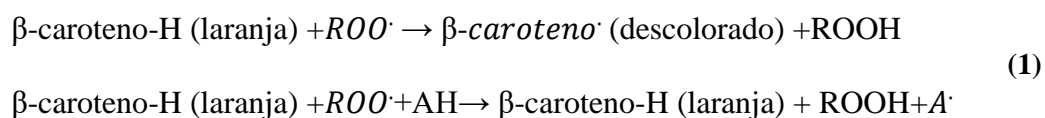
O ensaio do poder redutor é considerado simples, rápido, económico e bastante fiável, podendo ser aplicado de uma forma manual, automatizada ou semi-automatizada (Pior *et al.*, 2005). No entanto, qualquer substância, com potencial redox inferior ao par Fe^{3+} / Fe^{2+} , capaz de doar elétrons pode influenciar o ensaio. Por outro lado, um antioxidante capaz de reduzir pro-oxidantes pode ser capaz de reduzir o Fe^{3+} , não sendo detetados os compostos que captam radicais (Karadag *et al.*, 2009). Finalmente, os compostos que absorvem no mesmo comprimento de onda podem interferir na determinação, causando sobrestimação de resultados (Magalhães *et al.*, 2008).

2.3.3.3 Ensaio da inibição da descoloração do β -caroteno

O ensaio de inibição da descoloração do β -caroteno é amplamente utilizado para medir a atividade antioxidante dos compostos bioativos, uma vez que o β -caroteno é extremamente suscetível à oxidação do radical linoleato (Bougatef *et al.*, 2008). O β -caroteno sofre descoloração rápida na ausência de um antioxidante. Durante a oxidação, um elétron (acompanhado de um átomo de hidrogénio) é removido do ácido linoleico, dando posteriormente origem ao radical livre pentadienilo que, em seguida, ataca as moléculas altamente insaturadas do β -caroteno num esforço para readquirir o elétron. Como as

moléculas de β -caroteno perdem a sua conjugação, os carotenoides perdem a cor laranja característica, num processo que pode ser monitorizado espectralmente ($\lambda = 470$ nm). A presença de um antioxidante (nomeadamente, fenólico) pode impedir a extensão da destruição do β -caroteno ao neutralizar o radical livre linoleato (ou seja, utilizando o seu potencial redox) e quaisquer outros radicais livres formados no interior do sistema.

Assim, para inibir a descoloração do β -caroteno adiciona-se uma amostra contendo antioxidantes ou extratos vegetais pois estes podem ceder eletrões aos radicais, prevenindo assim a descoloração do β -caroteno (Amorowicz *et al.*, 2004), conforme descrito nas seguintes equações:



onde ROO^\cdot representa o radical livre linoleato e AH representa os antioxidantes presentes num extrato vegetal.

2.3.4 Atividade antimicrobiana

A investigação da atividade biológica de extratos de plantas e produtos naturais revela o potencial das plantas como fonte de novos agentes de conservação. Os estudos sobre os extratos e compostos químicos de plantas têm aumentado nas últimas décadas, e têm sido aplicados na produção de medicamentos para humanos e animais. Não só os extratos contendo compostos fenólicos, como também os óleos essenciais de diversas plantas, apresentam atividade biológica, o que justifica mais estudos sobre este assunto, nomeadamente na caracterização da atividade antimicrobiana.

Nos últimos anos, o estudo da atividade antimicrobiana e seus métodos de avaliação tem merecido maior atenção por parte de vários investigadores. Normalmente, recorre-se a testes de suscetibilidade antimicrobiana para pesquisa, *in vitro*, de potenciais agentes antimicrobianos. Para avaliar a suscetibilidade dos microrganismos ao agente em causa pode-se recorrer a vários métodos. O método de difusão em ágar e os métodos de diluição em ágar ou meio líquido (caldo) são os mais simples e mais utilizados. Os métodos de diluição permitem determinar a concentração mínima inibitória (MIC), ou seja, a concentração mais baixa de um agente antimicrobiano que impede o crescimento de um

microrganismo.

O método mais comumente utilizado para avaliação do perfil de resistência antimicrobiana de bactérias isoladas é o método de difusão em ágar. Tem sido muito utilizado devido à facilidade de uso, baixo custo, reprodutibilidade, e flexibilidade no tipo e número de amostras que podem ser testadas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Padrões e reagentes

Os reagentes 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), hidróxido de potássio (85% de grau de pureza), sulfato de magnésio (99,5%), cloreto de iodonitrotetrazólio (95%), nisina (2,5%) foram adquiridos à empresa Sigma-Aldrich Chemical Co; o β -caroteno (95%) foi adquirido através da empresa Cayman Chemicals; cefotaxima (98%) foi adquirido à empresa Acros Organics; o ácido linoleico (99%) à Alfa Aesar; o trolox é da marca Acros Organics e o grau de pureza é 97%; o cloreto de sódio (99,5%) e o metanol (99,8%) foram adquiridos à empresa AnalaR Normapur; o *n*-heptano, com pureza adequada para GC, foi comprado à Chromanorm Co.

O padrão usado na determinação de compostos fenólicos totais foi o ácido gálico (98%), da marca Merck e para a determinação de flavonoides totais utilizou-se como padrão a catequina (98%), adquirida na Cayman Chemical. O reagente de Folin-Ciocalteu e o Tween 80 foram adquiridos à Panreac. Para a preparação das diversas soluções, utilizou-se carbonato de sódio, nitrito de sódio, cloreto de alumínio, hidróxido de sódio, tampão fosfato de sódio, ferricianeto de potássio, ácido tricloroacético, cloreto de ferro, ácido sulfúrico e ácido clorídrico concentrado, de pureza pró-análise.

Os reagentes utilizados nos géis hidrossolúveis foram os seguintes: carbopol 940, da marca Fagron; trietanolamina que foi adquirido à empresa Carlo Erba; ácido cítrico da marca Panreac; EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) dissódico foi adquirido à empresa V.P., a imidazolidinil ureia à Alfa Aesar e o propilenoglicol à Labchem.

3.2 Determinação dos compostos bioativos

3.2.1 Obtenção e preparação das amostras

A amostra da planta seca de *Satureja montana* foi adquirida através da empresa Cantinho das Aromáticas (empresa portuguesa sediada em Vila Nova de Gaia, que tem como principais finalidades a produção, secagem, embalagem e comercialização de ervas aromáticas secas) tendo sido transportada num saco de papelão até ao laboratório e as folhas foram separadas dos caules para posterior análise.

Parte da amostra foi triturada num moinho, modelo IKA A11 BASIC, e armazenada

a -20°C dentro de um goblé tapado com parafilm e a restante amostra ficou à temperatura ambiente.

Foi ainda adquirido óleo essencial comercial de *Satureja montana*, através da empresa Casa das Essências (Oeiras, Portugal).

3.2.2 Extração do óleo essencial da amostra

O óleo essencial da amostra analisada foi obtido através do método da hidrodestilação usando um aparelho Clevenger. Para a hidrodestilação colocou-se 50 g de amostra triturada num balão de fundo redondo de 1000 mL e adicionou-se 500 mL de água destilada. A amostra foi misturada com a água agitando manualmente o balão e posteriormente o balão foi colocado numa manta de aquecimento para se proceder à extração do óleo essencial. O processo de extração decorreu por um período de aproximadamente 3 horas e foi repetido por forma a obter óleo suficiente para as análises subsequentes. No final, o óleo essencial extraído foi recolhido para frascos de vidro aos quais se adicionou sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) para absorver a água que possa vir juntamente com o óleo extraído e de seguida foram guardados no frigorífico a -20°C .

Na Figura 7 está representada a montagem usada para a hidrodestilação da amostra de Segurelha.



Figura 7. Aparelho de Clevenger para a realização da hidrodestilação e uma amostra de óleo essencial extraído de Segurelha seca guardado num frasco de vidro.

3.2.3 Preparação dos extratos

Para a extração de compostos fenólicos utilizou-se cerca de 2 g de amostra, tendo sido preparados dois tipos de extratos, nomeadamente decocção e extrato hidroetanólico. Neste último, a amostra foi misturada com 100 mL de etanol:água (80:20, v/v), tendo a extração decorrido sob agitação (320 rpm) durante 1 hora, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após agitação, as amostras foram colocadas num banho de ultrassons (J.P.Selecta, Espanha) durante 5 minutos a 50 Hz e de seguida procedeu-se à filtração com papel de filtro Whatman N° 4. Para a decocção, a amostra foi extraída com 100 mL de água à ebulição durante 5 minutos. Após arrefecimento, a solução obtida foi filtrada usando papel de filtro Whatman N° 4. Em ambos os casos, o resíduo obtido foi reextraído sob as mesmas condições. De seguida, para cada amostra procedeu-se à junção dos extratos. Para o extrato hidroetanólico, procedeu-se inicialmente à evaporação do solvente orgânico a 40 °C em evaporador rotativo. Seguidamente, e de igual forma para a decocção, o extrato foi congelado e liofilizado. O resíduo obtido foi redissolvido nos respetivos solventes de extração e utilizado após diluição adequada. O processo de extração foi feito em duplicado.

Na Figura 8 encontra-se a imagem do evaporador rotativo utilizado neste trabalho.



Figura 8. Evaporador rotativo, (Buchi), utilizado na preparação de extratos.

3.3 Determinação da composição química

3.3.1 Compostos voláteis

A determinação da composição química do óleo essencial comercial e do óleo essencial extraído da amostra de *Satureja montana* foi realizada pela técnica de Cromatografia Gasosa acoplada a detecção por Espectrometria de Massas (GC-MS).

A unidade GC-MS consiste num cromatógrafo GC-2010 Plus, da marca Shimadzu, equipado com injetor automático AOC-20iPlus (Shimadzu) e com uma coluna de sílica fundida SH-RXi-5ms (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm; Shimadzu, USA). O programa de temperatura do forno foi o seguinte: temperatura inicial de 40 °C, durante 4 min, em seguida aumentou-se a temperatura 3 °C/min até 175 °C, 15 °C/min até 300°C e foi mantida durante 10 min. O volume da amostra injetado correspondeu a 1 µL, com uma razão de Split 1:10, sendo a temperatura do injetor 260 °C e a temperatura do detetor 280 °C, a temperatura da fonte iónica foi de 220 °C. A energia de ionização foi 870 eV, tendo-se utilizado uma faixa de varrimento de 35-500 u, com tempo de varrimento de 0,3 s.

A identificação dos compostos foi baseada na comparação dos espectros obtidos com os da biblioteca espectral de massa NIST17, considerando-se uma percentagem de similaridade >90%, e foram confirmados usando os índices de retenção lineares determinados a partir dos tempos de retenção de uma mistura de n-alcanos (C8-C40, ref. 40147-U, Supelco) analisados em condições idênticas. Adicionalmente, e quando possível, procedeu-se ainda à comparação com os dados publicados na literatura e à comparação com compostos padrão comerciais.

A quantificação dos diferentes compostos foi realizada usando valores relativos das áreas dos picos, obtidas diretamente dos valores de corrente total de iões (TIC).

3.3.2 Compostos fenólicos totais

A determinação do teor de compostos fenólicos totais do extrato hidroetanólico e da decocção, preparados a partir das folhas de *Satureja montana*, foi realizada através de espectrofotometria num leitor de microplacas (Epoch 2, Biotek), utilizando o reagente Folin-Ciocalteu. Para a obtenção da curva de calibração utilizou-se uma solução

metanólica de ácido gálgico, composto fenólico usado como padrão, com concentrações de 0,005; 0,01; 0,05; 0,1 e 0,25 mg/mL. Para análise foram preparadas diferentes concentrações dos extratos das amostras, tendo-se usado diluições seriadas (1:2), se necessário.

Num tubo de ensaio misturou-se 500 μ L de extrato de cada amostra ou padrão com 2,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu (1:10 v/v, em água) e 2 mL de carbonato de sódio (75 g/L). Os tubos foram vortexados por 15 segundos e colocados a repousar no escuro, durante 30 minutos a 40 °C, para o desenvolvimento de cor. Em simultâneo, foi preparado um branco contendo 500 μ L de metanol, 2,5 mL de Folin-Ciocalteu e 2 mL de carbonato de sódio. No final, caso a solução se apresentasse turva com partículas em suspensão, procedeu-se à sua centrifugação a 12000 rpm durante 2 minutos. De seguida transferiram-se as amostras/padrões de cada tubo de ensaio para uma placa com auxílio de uma micropipeta. Para a preparação do branco de reação, procedeu-se de forma similar utilizando metanol.

Por último, mediu-se a absorvância de cada diluição preparada a 765 nm no leitor de microplacas e foi calculada a concentração em termos de compostos fenólicos totais utilizando a curva padrão obtida com ácido gálgico. Os resultados foram expressos em mg equivalentes de ácido gálgico por grama de extrato (mg AG/g extrato).

Na Figura 9 apresenta-se uma imagem com o aspeto final dos padrões feitos com ácido gálgico em tubos de ensaio e em microplaca.

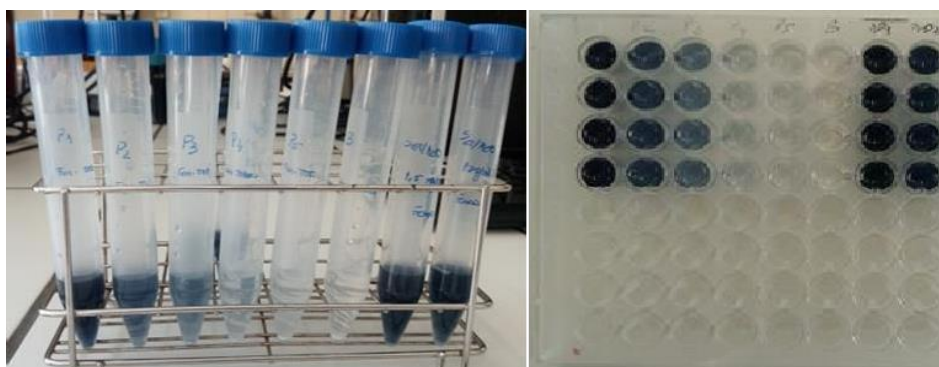


Figura 9. Padrões preparados com ácido gálgico para a determinação dos fenóis totais.

3.3.3 Flavonoides totais

A determinação de flavonoides totais do extrato hidroetanólico e da decocção, foi realizada por espectrofotometria e num leitor de microplacas, tendo-se utilizado uma solução padrão de catequina com concentrações de 0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,25 e 0,5 mg/mL para obtenção da curva de calibração. Prepararam-se diferentes concentrações dos extratos das amostras por diluição em metanol, adequadas à curva de calibração usada. Misturou-se 500 μ L da solução de extrato ou padrão com 2 mL de água destilada e, posteriormente, com 150 μ L da solução de NaNO₂ (5%, m/v). Os tubos foram vortexados por 15 segundos e deixados a repousar por 6 minutos no escuro. Após adição de 150 μ L de solução de AlCl₃ (10%, m/v), os tubos foram levados ao vortex por 15 segundos e deixados a repousar por mais 6 minutos no escuro. Misturou-se 2 mL da solução de NaOH (4%, m/v), 200 μ L de água destilada, vortexou-se por 15 segundos e deixou-se repousar por mais 15 minutos no escuro. No final, caso a solução se apresentasse turva/com partículas em suspensão, procedeu-se à sua centrifugação a 12000 rpm durante 2 minutos. De seguida os padrões foram transferidos dos tubos de ensaio para uma placa com auxílio de uma micropipeta. Para a preparação do branco de reação, procedeu-se de forma similar utilizando metanol.

Por último, mediu-se a absorvância a 510 nm e calculou-se a concentração de flavonóides totais utilizando uma curva padrão obtida com catequina, sendo os valores expressos em mg equivalentes de catequina por g de extrato (mg Cateq/g de extrato).

Na Figura 10 apresenta-se uma imagem com o aspeto final dos padrões de catequina, em tubos de ensaio.

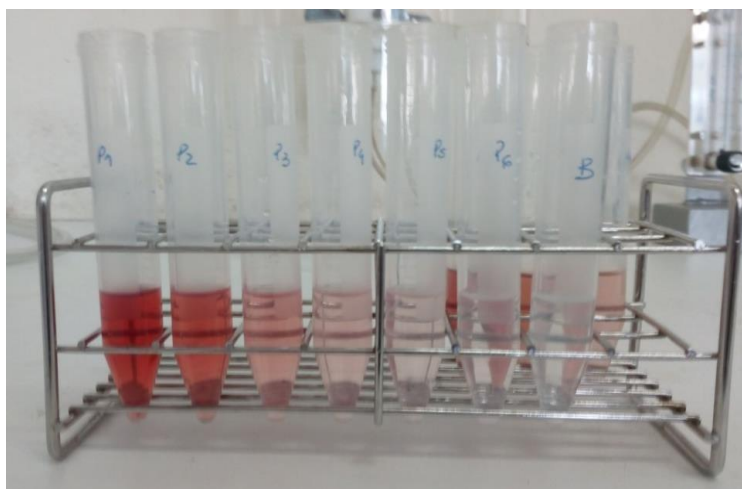


Figura 10. Padrões preparados com catequina para a determinação dos flavonoides totais.

3.4 Determinação da atividade antioxidante

3.4.1 Captação do radical DPPH

A determinação da atividade antioxidante pelo método do radical DPPH do extrato hidroetanólico e da decocção, foi realizada usando o leitor de microplacas e num espectrofotômetro de feixe duplo (Jasco V-530, 2004), tendo-se utilizado Trolox como padrão de referência (com concentrações entre 0,0039 mg/mL e 0,5 mg/mL), tendo sido utilizado metanol como solvente. Para as amostras dos extratos foram preparadas diferentes diluições (0,03125; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5 e 1 mg/mL). Misturou-se 100 µL de cada uma das diferentes concentrações de extrato com 900 µL de solução metanólica de DPPH (6×10^{-5} mol/L), homogeneizou-se e colocou-se a mistura obtida no escuro durante 1 hora. Para a preparação do branco de reação, procedeu-se de forma similar utilizando metanol. A redução do radical DPPH foi avaliada através da medição da absorvância a 517 nm. A atividade captadora de radicais livres (ACR) foi calculada em função da percentagem de descoloração de DPPH usando a equação 2:

$$\% \text{ ACR} = [(\text{Abs DPPH} - \text{Abs Sol}) / \text{Abs DPPH}] \times 100 \quad (2)$$

Onde Abs Sol representa a absorvância da solução na presença de extrato numa determinada concentração e Abs DPPH representa a absorvância da solução de DPPH (branco de reação). A concentração mínima de antioxidante necessário para reduzir em 50% a concentração inicial da atividade captadora de radicais (EC50), foi calculada por interpolação a partir do gráfico de percentagem ACR em função da concentração da amostra. Todos os extratos foram analisados em duplicado.

Na Figura 11 apresenta-se uma fotografia com as amostras do extrato hidroetanólico.

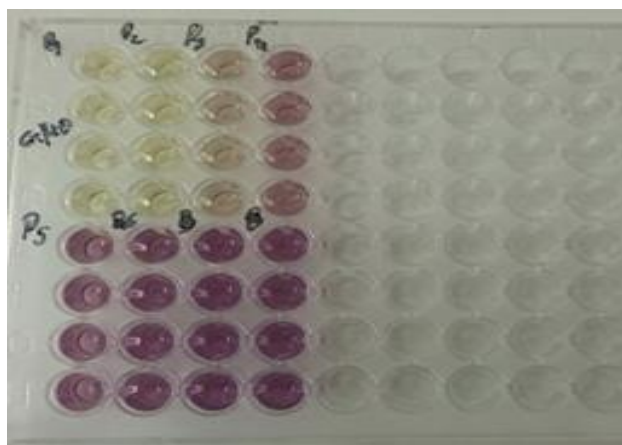


Figura 11. Determinação da % de captação do radical DPPH para o extrato hidroetanólico.

3.4.2 Poder redutor

A determinação do poder redutor foi realizada por espectrofotometria e utilizado um leitor de microplacas, onde foram preparadas diferentes diluições dos extratos hidroetanólico e decocção (entre 0,03125 mg/ mL e 0,5 mg/ mL). Misturou-se 500 μ L de extrato com 500 μ L de solução tampão de fosfato de sódio (0,2 mol/L a pH=6,6) e 500 μ L de solução de ferricianeto de potássio (1%, m/v). A mistura foi homogeneizada e incubada a 50 °C durante 20 minutos e, após arrefecimento, adicionou-se 500 μ L de ácido tricloroacético (10%, m/v) e de seguida homogeneizada e centrifugada a 12000 rpm durante 2 minutos. Foi retirado 1 mL da fase superior da mistura anterior para um tubo de ensaio e adicionou-se 1 mL de água desionizada e 0,2 mL de FeCl₃ (0,1%, m/v). Para a preparação do branco de reação, procedeu-se de forma similar utilizando metanol. A absorvância da mistura obtida foi medida a 690 nm num leitor de microplacas e num espectrofotómetro. A concentração de extrato correspondente ao EC₅₀ (concentração de extrato correspondente a 0,5 de absorvância), foi calculada a partir do gráfico de absorvância a 690 nm em função da concentração do extrato. Como padrão de referência utilizou-se uma solução de trolox em metanol com concentrações entre 0,0039 mg/ mL e 0,5 mg/ mL (Figura 12). Todos os extratos foram analisados em triplicado.

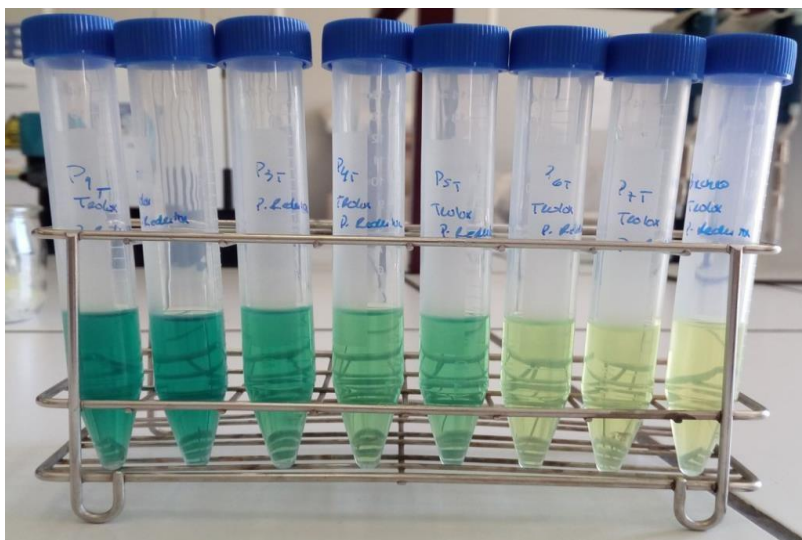


Figura 12. Fotografia da determinação do poder redutor da solução padrão de Trolox.

3.4.3 Inibição da descoloração do β -caroteno

A determinação da inibição da descoloração do β -caroteno do extrato hidroetanólico e da decocção foi executada num espectrofotômetro de feixe duplo (JascoV-530, 2004). Preparou-se uma solução de β - caroteno (2 mg/mL) em clorofórmio e transferiu-se 1,5 mL desta solução para um balão de fundo redondo. Procedeu-se à evaporação do solvente em corrente de azoto, adicionou-se ácido linoleico (40 mg), emulsificante Tween 80 (400 mg) e água destilada (100 mL), agitando-se manualmente muito bem. Seguidamente, transferiram-se 4,8 mL de emulsão obtida para tubos de Falcon contendo 200 μ L de diferentes concentrações de extrato. Imediatamente após a adição da emulsão, procedeu-se à homogeneização da mistura e leu-se a absorvância a 470 nm (correspondente ao tempo zero, T0). Os tubos foram protegidos da luz com folha de alumínio e foram colocados durante 2 horas de incubação, no escuro, a 50 °C com agitação (100 rpm), mediu-se novamente a absorvância. Em simultâneo, foi preparado um branco de reação utilizando 200 μ L de metanol. Foi ainda preparada uma emulsão sem β -caroteno para obtenção do zero de absorvância no espectrofotômetro. A inibição da descoloração do β -caroteno foi calculada utilizando a seguinte equação 3:

$$\% \text{ Inibição da descoloração do } \beta\text{-caroteno} = (\text{conteúdo de } \beta\text{-caroteno após 2 h de ensaio} / \text{conteúdo inicial de } \beta\text{-caroteno}) \times 100 \quad (3)$$

A concentração de extrato que origina 50% de atividade antioxidante (EC50) foi calculada por interpolação a partir do gráfico de percentagem da inibição da descoloração do β -caroteno em função da concentração de extrato.

3.5 Determinação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi avaliada por três metodologias distintas, nomeadamente pelo método da difusão em agar, pelo método da macrodiluição em caldo e pelo método da microdiluição em microplacas, tendo os dois primeiros sido utilizados para as amostras de óleo essencial e o último para as amostras dos extratos (hidroetanólico e decocção). Em todos os casos a atividade antimicrobiana foi avaliada usando os seguintes microrganismos de referência: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048), *Proteus mirabilis* (ATCC 14153), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853),

Bacillus cereus (ATCC 10876), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433) e *Candida albicans* (ATCC 2091). As culturas foram obtidas por crescimento em caldo nutritivo durante 24 horas, a 37°C.

3.5.1 Método da difusão em placas de agar

Os ensaios aplicando o método da difusão em placas foram realizados em placas de petri esterilizadas contendo meio Mueller Hinton (Himedia). Após ajustar cada um dos inóculos a 0,5 McFarland (aproximadamente 10^8 UFC/mL), as placas foram inoculadas por sementeira à superfície utilizando uma zaragatoa estéril. Procedeu-se à impregnação dos discos de papel (6 mm de diâmetro), previamente esterilizados, colocando em cada disco 15 µL de cada um dos óleos essenciais, sendo utilizado óleo essencial comercial e o extraído da planta usando o Clevenger.

As placas foram seladas com parafilm, de forma a evitar a desidratação do meio e a perda de compostos voláteis, e foram colocadas na estufa a 37 °C durante 24 horas. Após o período de incubação, mediram-se os halos de inibição (em mm). Todos os processos descritos foram realizados em câmara de segurança biológica (Telstar Bio II Advance) de modo a garantir o máximo de condições de esterilidade.

Na Figura 13 apresenta-se uma imagem do método de difusão em placas com a bactéria *Enterobacter*, usando óleo comercial e o óleo extraído em laboratório.

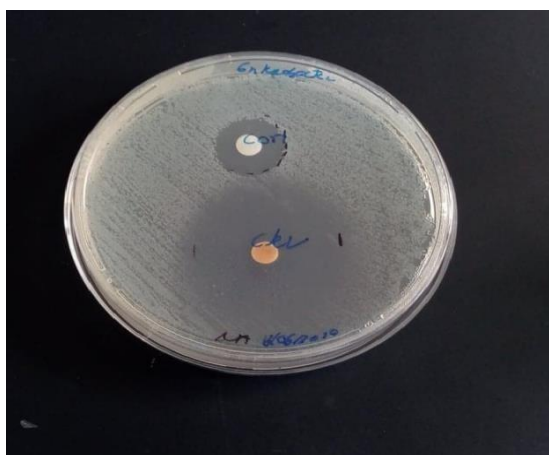


Figura 13. Método da difusão em placas com a bactéria *Enterobacter*, usando o óleo comercial (COM) e o óleo extraído em laboratório (Clev).

3.5.2 Método da macrodiluição

A atividade antimicrobiana do óleo essencial comercial e do óleo essencial extraído de Segurelha foi também avaliada pelo método da macrodiluição em caldo, segundo o método do Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI), com algumas modificações.

Este método consiste na preparação da diluição do agente antimicrobiano num meio de crescimento líquido, em tubos com um volume mínimo de 2 mL.

De início colocou-se 100 mL de caldo Muller-Hinton (Muller-Hinton Broth- MHB) num matraz de 250 mL e adicionou-se 500 µL de Tween 80, ficando uma solução de Tween 80 a 0,5% em MHB. Seguidamente procedeu-se à diluição das amostras de óleo essencial (OE) de Segurelha em tubos de ensaio, tendo-se preparado as diluições a 5%, 2,5%, 1,25%, 0,625%, 0,3125%, 0,16% e 0,078% (v/v). Para preparar a diluição a 5% de OE pipetou-se para um tubo de ensaio 1900 µL da solução Tween 80 a 0,5% em MHB adicionando-se 100 µL de óleo essencial. A amostra foi vortexada muito bem de modo a formar uma emulsão e procedeu-se à diluição seriada. Seguidamente, foi preparado o inóculo de cada microrganismo. Para tal, primeiramente ajustou-se a concentração do microrganismo à escala de 0,5 McFarland, tendo-se posteriormente diluído, para obter uma concentração final de aproximadamente 5×10^5 UFC/mL.

Após preparação do inóculo, adicionou-se 1000 µL a cada um dos tubos, incluindo o branco e vortexou-se novamente. Desta forma, os óleos essenciais foram testados com concentrações finais entre 2,5% e 0,039% (v/v). Por fim, os tubos foram incubados na estufa a 37 °C durante 24 horas. No final os tubos foram observados visualmente para determinação da concentração mínima inibitória (MIC), correspondendo esta à menor concentração de OE que consegue inibir o crescimento visível do microrganismo. Seguidamente, avaliou-se a concentração mínima bactericida (MBC), correspondendo à concentração da amostra de óleo essencial que resulta na morte bacteriana, por plaqueamento de uma amostra dos tubos para os quais não houve crescimento visível.

Na Figura 14, apresenta-se um exemplo de uma das diluições feitas para a avaliação da atividade antimicrobiana (esquerda) e um exemplo do resultado final após ter sido feito o espalhamento em placas com ágar nutritivo (direita).

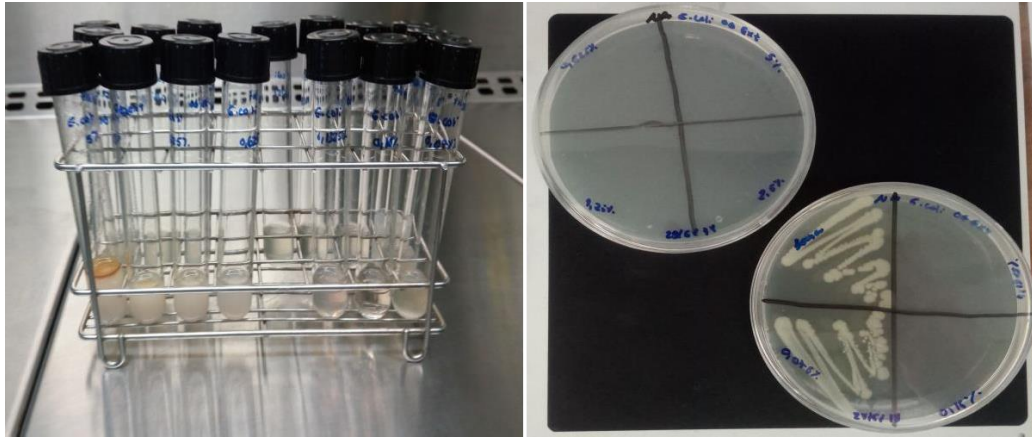


Figura 14. Diluições feitas para a avaliação da atividade antimicrobiana (esquerda) e crescimento após 24h na estufa para determinação da MBC (direita).

3.5.3 Método da microdiluição

Para o estudo da atividade antimicrobiana do extrato hidroetanólico e da decocção utilizou-se o método da microdiluição em caldo segundo o método do Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI), com algumas modificações, nomeadamente tendo-se adaptado os volumes usados de inóculo, solução de agente antimicrobiano (cefotaxima, nisina ou extrato) e meio de cultura. Inicialmente, efetuou-se a padronização do inóculo à escala de 0,5 McFarland. Seguidamente, utilizando placas de 96 poços de fundo plano estéreis, adicionou-se meio MHB e solução de agente antimicrobiano, procedendo-se em seguida à sua diluição seriada (1/2) por forma a obter um volume final de 150 μ L. Por último, adicionou-se 15 μ L de meio de cultura inoculado com o microrganismo teste. Como controlos usou-se meio (MHB) adicionado com inóculo (controlo de crescimento) e meio MHB (controlo negativo). As placas foram incubadas durante 24 horas a 37 °C. Após incubação, observou-se a presença ou ausência de turvação e adicionou-se 40 μ L de uma solução de cloreto de p-iodonitrotetrazólio (0,2 mg/mL) a todos os poços. As microplacas foram colocadas na estufa a 37 °C durante 30 minutos e posteriormente observou-se os poços relativamente à mudança de coloração para cor-de-rosa. Os resultados foram expressos em concentração mínima inibitória (MIC) definida como a concentração mínima de extrato necessária para promover a inibição do crescimento bacteriano. Na Figura 15 apresenta-se uma imagem do método da microdiluição com a bactéria *Proteus mirabilis*.

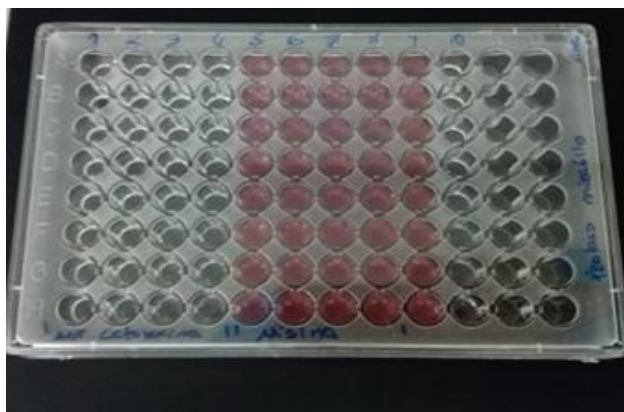


Figura 15. Método da microdiluição com a bactéria *Proteus mirabilis*.

3.6 Preparação e avaliação de hidrogéis

Para a obtenção do hidrogel, inicialmente adicionou-se 0,5 g de Carbopol 940 a 20 mL de água desionizada, tendo-se deixado a mistura em repouso durante 1h, para hidratação do polímero. Seguidamente, a mistura foi colocada em agitação e adicionou-se 1 mL de trietanolamina e 2 mL de extrato (hidroetanólico ou decocção) a 10 mg/ mL (correspondente a uma concentração final de aproximadamente 400 μ g extrato/g hidrogel). De seguida, adicionou-se ácido cítrico (0,45 g), EDTA dissódico (0,005 g), imidazolidinil-ureia (0,1 g) e propileno glicol (7,5 g). O produto final foi ajustado a 50 g, por adição de água desionizada, e submetido a ensaios de composição química e atividade antioxidante. Para melhor estimar a concentração final de extrato, procedeu-se à determinação da densidade de uma solução aquosa (1/4) do hidrogel por gravimetria, tendo sido esta solução usada para as determinações subsequentes.

Preparou-se ainda uma formulação base nas mesmas condições, mas sem incorporar extrato (controlo negativo). Após diluição dos hidrogéis em água (1/4), estes foram avaliados relativamente ao teor de fenóis totais e atividade antioxidante como descrito nas secções anteriores.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Composição química

4.1.1 Quantificação e identificação dos compostos do óleo essencial da Segurelha

A análise por GC-MS foi realizada para o óleo essencial extraído por Clevenger e para o óleo essencial comercial de Segurelha. Esta análise permitiu identificar no total 58 compostos diferentes quando considerados os dois tipos de óleos utilizados neste estudo (Tabela 1).

As quantidades dos compostos dos óleos essenciais foram determinadas pelo método de normalização da área dos picos, após integração dos mesmos nos cromatogramas obtidos. Nas Figuras 16 e 17, apresentam-se os cromatogramas referentes ao óleo comercial e óleo essencial extraído em Clevenger, respectivamente, sendo visível a complexidade das amostras analisadas, em particular do óleo extraído laboratorialmente.

Tabela 1. Composição química (% abundância relativa) dos óleos essenciais extraídos das folhas e óleo comercial de Segurelha (média \pm desvio padrão).

Nº	COMPOSTO	RT (min)	LRI ^a	LRI ^b	OE CLEV	OE OC
1	α -Tujeno	13,91	925	924	0,168 \pm 0,007	0,0079 \pm 0,007
2	α -Pino	14,24	932	932	0,95 \pm 0,04	2,22 \pm 0,05
3	Canfeno	14,97	946	946	0,43 \pm 0,02	0,43 \pm 0,04
4	β -Pino	16,43	974	974	0,162 \pm 0,007	0,47 \pm 0,02
5	1-Octen-3-ol	16,67	978	-	1,65 \pm 0,07	-
6	Mirceno	17,25	989	988	0,66 \pm 0,33	0,88 \pm 0,03
7	3-Octanol	17,51	994	-	0,061 \pm 0,003	-
8	α -Felandreno	17,89	1002	1002	0,157 \pm 0,008	-
9	3-Carene	18,19	1008	1008	0,076 \pm 0,003	-
10	4-Carene	18,54	1014	1011	1,60 \pm 0,09	-
11	<i>p</i> -Cimeno	18,93	1022	1020	14,8\pm0,5	18,9\pm0,2
12	Limoneno	19,14	1026	1024	-	9,3\pm0,1
13	Silvestreno	19,21	1027	-	0,77 \pm 0,03	-
14	1,8-Cineol	19,31	1029	1031	1,07 \pm 0,04	2,85 \pm 0,03
15	γ -Terpineno	20,71	1056	1054	3,1\pm0,1	0,71 \pm 0,02
16	Hidrato de <i>cis</i> -sabineno	21,16	1065	1065	0,144 \pm 0,003	-
17	Fenchone	22,25	1086	1083	-	0,25 \pm 0,01
18	Terpineno	22,27	1086	1086	0,28 \pm 0,01	-
19	Linalol	22,83	1097	1095	1,21 \pm 0,05	10,2\pm1,2
20	<i>cis-p</i> -Ment-2-eno-1-ol	23,94	1119	1118	0,053 \pm 0,003	-
21	Cânfora	25,06	1142	1141	0,047 \pm 0,002	0,67 \pm 0,04
22	Borneol	26,17	1164	1165	2,170 \pm 0,111	0,77 \pm 0,04
23	Terpinen-4-ol	26,71	1175	1174	1,46 \pm 0,08	0,64 \pm 0,05
24	<i>p</i> -Cimen-8-ol	27,09	1183	1179	0,042 \pm 0,005	-

Nº	COMPOSTO	RT (min)	LRI ^a	LRI ^b	OE CLEV	OE OC
25	α -Terpineol	27,36	1188	1186	0,291 \pm 0,002	0,66 \pm 0,05
26	Estragole	27,72	1196	1195	-	0,51 \pm 0,04
27	Cuminaldeído	29,70	1238	1238	-	0,21 \pm 0,02
28	Éter metílico de carvacrol	29,92	1242	1241	0,14 \pm 0,01	-
29	Timoquinona	30,19	1248	1248	0,24 \pm 0,01	-
30	Acetato de linalol	30,46	1254	1254	-	1,4 \pm 0,1
31	Anetole	31,84	1283	1282	-	1,31 \pm 0,04
32	Timol	32,15	1290	1289	0,32 \pm 0,03	28,2\pm0,6
33	Carvacrol	32,57	1299	1298	50,4\pm1,0	4,0 \pm 0,1
34	Piperitone	34,50	1342	1340	0,024 \pm 0,001	-
35	Eugenol	35,07	1356	1356	0,079 \pm 0,007	0,30 \pm 0,01
36	Ilangeno	35,82	1373	1373	0,135 \pm 0,009	-
37	α -Copaeno	36,03	1377	1374	0,31 \pm 0,01	-
38	β -Bourboneno	36,42	1386	1387	0,125 \pm 0,002	-
39	Tetradecano	36,91	1397	1400	0,122 \pm 0,006	-
40	β -Cariofileno	37,95	1421	1417	3,4\pm0,1	0,76 \pm 0,04
41	β -Copaeno	38,31	1431	1430	0,067 \pm 0,001	-
42	Aromadendreno	38,73	1441	1439	0,19 \pm 0,02	-
43	α -Humuleno	39,35	1455	1452	0,141 \pm 0,004	-
44	γ -Muuroleno	40,28	1478	1478	0,395 \pm 0,007	-
45	β -Selineno	40,71	1488	1489	0,054 \pm 0,003	-
46	α -Muuroleno	41,25	1501	1500	0,171 \pm 0,005	-
47	β -Bisaboleno	41,54	1509	1505	0,65 \pm 0,02	-
48	γ -Cadineno	41,83	1516	1513	0,38 \pm 0,02	-
49	δ -Cadineno	42,18	1525	1522	0,81 \pm 0,04	-
50	α -Cadineno	42,74	1539	1537	0,058 \pm 0,003	-
51	α -Calacoreno	42,96	1545	1544	0,071 \pm 0,002	-
52	Timohidroquinona	43,33	1554	1553	2,82 \pm 0,07	-
53	Espatuleno	44,37	1580	1577	0,22 \pm 0,01	-
54	Óxido de cariofileno	44,58	1586	1582	1,32 \pm 0,07	0,227 \pm 0,021
55	α -Corocaleno	46,05	1624	1622	0,037 \pm 0,003	-
56	α -Cadinol	47,27	1657	1652	0,054 \pm 0,004	-
57	Cadaleno	48,02	1677	1675	0,26 \pm 0,02	-
58	α -Bisabolol	48,27	1684	1685	0,018 \pm 0,001	-
Totais compostos					96,6 \pm 0,7	95,97 \pm 0,07
identificados Monoterpenos					8	32,45 \pm 0,49
Monoterpenos contendo oxigénio					22,99 \pm 0,09	61,9 \pm 0,6
Sesquiterpenos					61,6 \pm 0,2	
Sesquiterpenos contendo oxigénio					7,20 \pm 0,080	0,72 \pm 0,039
Outros					1,83 \pm 0,06	0,23 \pm 0,02
					3,02 \pm 0,024	0,70 \pm 0,0054

RT: Tempo de retenção; LRI^a: Índice retenção linear teórico; LRI^b: Índice retenção linear calculado; OE: óleo essencial; CLEV: Clevenger; OC: óleo comercial.

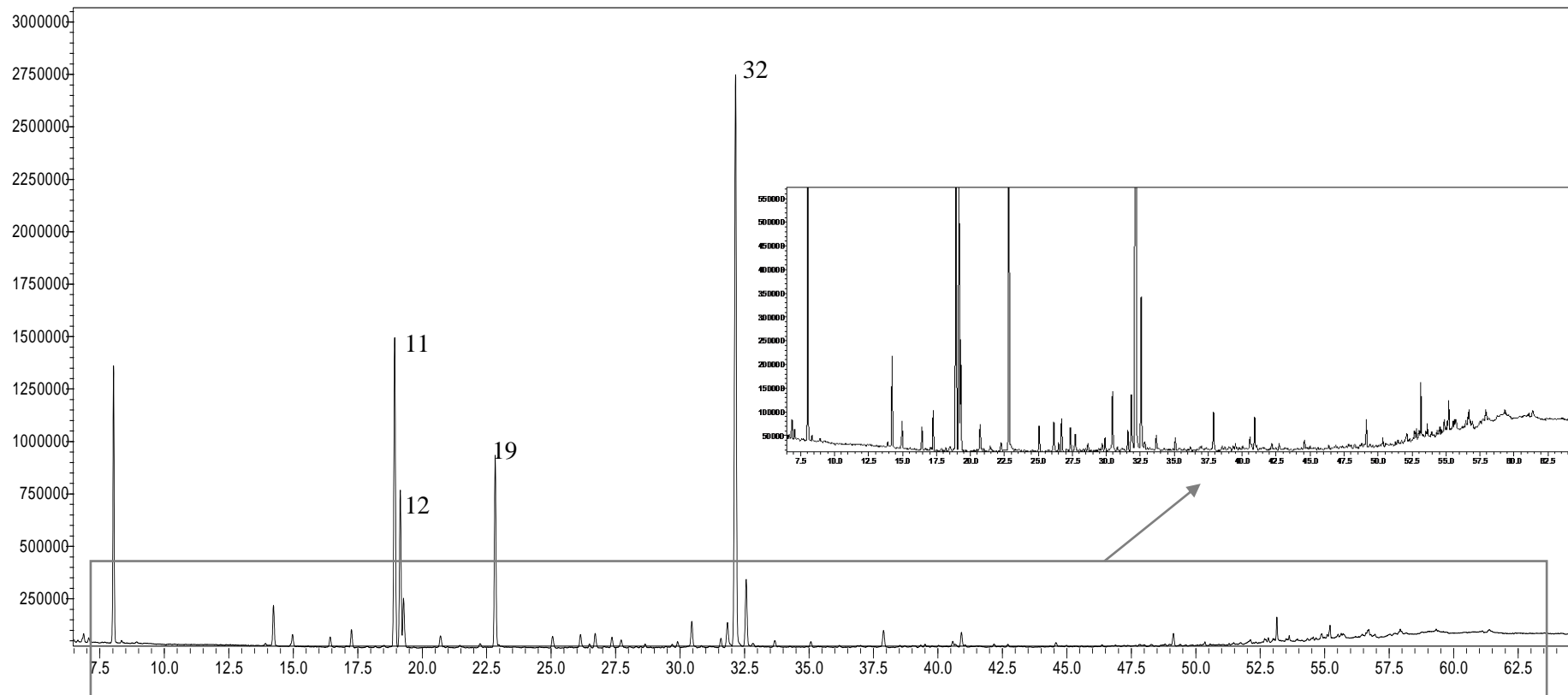


Figura 16. Cromatograma obtido por GC-MS do óleo essencial comercial e respectiva ampliação. Os picos maioritários encontram-se numerados conforme apresentado na Tabela 1 (*p*-cimeno (11); limoneno (12); linalol (19); timol (32)).

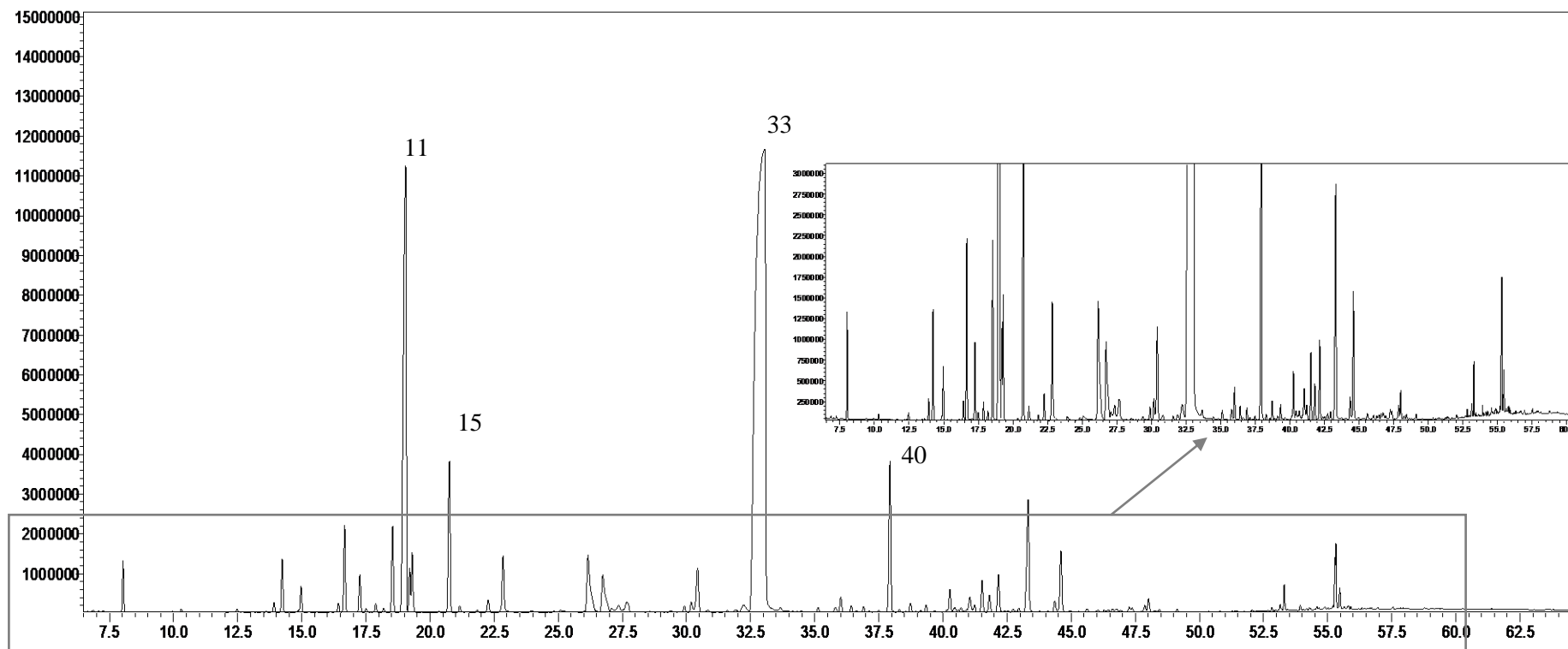


Figura 17. Cromatograma obtido por GC-MS para o óleo essencial extraído por Clevenger. Os picos maioritários encontram-se numerados conforme apresentado na Tabela 1, (carvacrol (33); p-cimeno (11); Y-terpineno (15); β -cariofileno (40)).

Para o óleo essencial comercial (Figura 16) foram identificados 24 compostos, correspondendo a 96% da área total dos picos presentes no cromatograma. Os compostos presentes em maior percentagem neste óleo essencial foram classificados como monoterpenos oxigenados e monoterpenos, sendo o composto maioritário o timol (28,2%), seguindo-se o *p*-cimeno (18,9%), linalol (10,2%) e limoneno (9,3%). Vários dos compostos identificados estavam presentes em baixos teores (<1%).

No óleo essencial extraído à escala laboratorial por método de Clevenger (Figura 17) observou-se a presença de um maior número de compostos, nomeadamente um total de 52. À semelhança do verificado no óleo comercial, na amostra extraída laboratorialmente usando um sistema Clevenger, os grupos maioritários foram igualmente os monoterpenos oxigenados, seguidos dos monoterpenos. No entanto, apresentou um teor muito superior em sesquiterpenos (7,2%) quando comparado com o óleo comercial (0,7%). De igual forma, quer o perfil qualitativo quer quantitativo, revelaram-se distintos daquele obtido para a amostra comercial, uma vez que os compostos identificados com maior percentagem foram o carvacrol correspondendo a (50,4%), seguido de *p*-cimeno (14,8%), β -cariofileno (3,4) e γ -terpineno (3,1%).

Refira-se que os compostos maioritários encontrados nas duas amostras, carvacrol e timol, são dois compostos muito similares, uma vez que são isómeros. À semelhança do verificado neste trabalho, ambos os compostos são referidos como sendo os compostos maioritários em diferentes trabalhos prévios.

No estudo realizado por Mastelic *et al.*, (2011) foi estudada a composição química do óleo essencial de *Satureja montana* colhida na Croácia, sendo o timol o composto detetado em maior quantidade. No entanto, à semelhança da amostra de segurelha extraída laboratorialmente, vários estudos apresentam o carvacrol como componente dominante do óleo (Radonic *et al.*, 2003; Caprioli *et al.*, 2019; Maccelli *et al.*, 2020; Navarro-Rocha, 2020).

Segundo a literatura disponível, o conteúdo de timol e carvacrol no óleo de *Satureja montana* é variável e depende da origem e do estágio vegetativo da planta, sendo que teores mais elevados de timol são mais comuns antes do estágio de floração, tendencialmente diminuindo à medida que a planta amadurece, (Radonic *et al.*, 2003).

4.1.2 Teor total de fenóis e de flavonoides

Nas últimas décadas, extratos de diferentes plantas medicinais têm sido estudados devido à sua atividade antioxidante, a qual é geralmente atribuída ao conteúdo em compostos fenólicos. Quimicamente, estes compostos definem-se como sendo substâncias que possuem pelo menos um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos. O número de compostos fenólicos descritos até à presente data é superior a oito mil estruturas diferentes, destacando-se os flavonoides, ácidos fenólicos e fenóis simples, entre outros (Vuolo *et al.*, 2009).

Como referido, neste trabalho foi avaliado o conteúdo em compostos fenólicos e flavonoides por forma a estimar o teor em compostos bioativos da planta em estudo. O teor total de fenóis foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu, sendo expresso em mg equivalentes de ácido gálgico. Inicialmente, procedeu-se à determinação utilizando um espectrofotómetro de feixe duplo.

Seguidamente a metodologia foi adaptada para utilização de um leitor de placas. Em ambos os casos, elaborou-se uma curva de calibração a partir dos valores obtidos para a absorvância a 765 nm, tendo-se utilizado uma solução padrão de ácido gálgico com concentração definida e respetivas diluições. Na Figura 18 apresenta-se uma das curvas de calibração obtidas quando utilizado o espectrofotómetro e o leitor de placas. Como, se pode verificar, todas as curvas de calibração apresentam uma elevada correlação, sendo, contudo, diferentes entre si. Por forma a verificar que a adaptação do método à utilização do leitor de placas não interferia nos valores obtidos, foram feitas diferentes diluições de uma amostra, sendo a sua absorvância lida no espectrofotómetro e leitor de placas (Tabela 2). Pela aplicação do teste *t-Student* conclui-se não haver diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre os resultados obtidos (mg/mL) tendo as restantes determinações sido realizadas no leitor de microplacas.

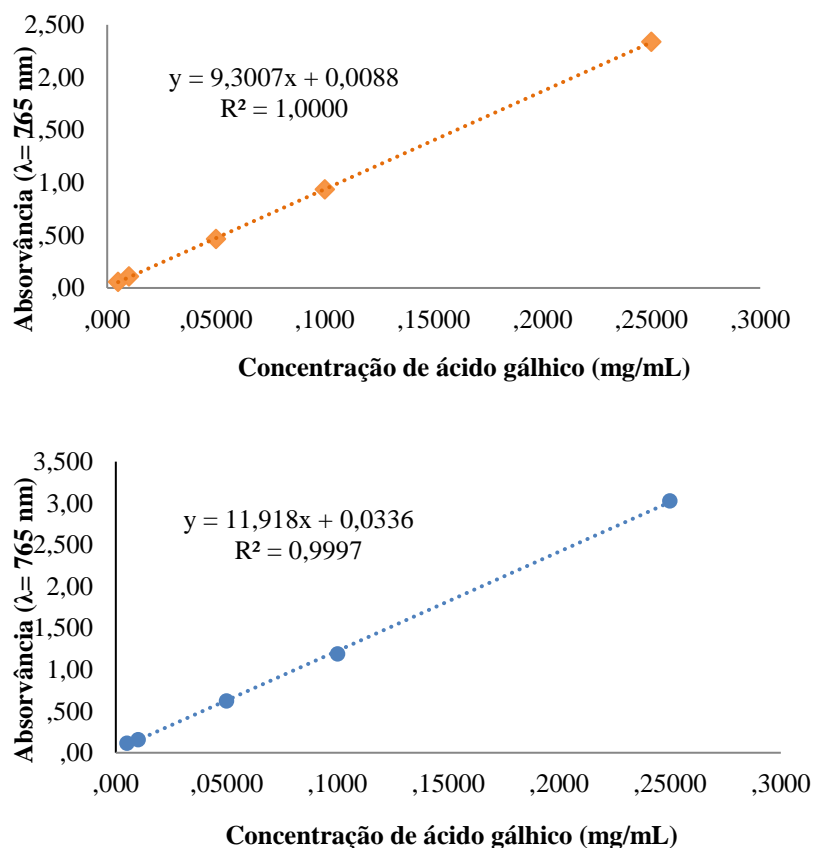


Figura 18. Curva de calibração para a determinação de fenóis totais (em cima obtida através da realização da leitura no leitor de microplacas e em baixo no espectrofotômetro).

Tabela 2. Resultados de absorvância ($\lambda=765$ nm) obtidos na análise de compostos fenólicos totais para diferentes diluições da mesma amostra, sendo as leituras realizadas em diferentes equipamentos.

Espectrofotômetro	Leitor de placas	teste <i>t-Student</i> valor-p
0,2530±0,0020	0,2533±0,0004	0,2704
0,1570±0,0004	0,1530±0,0005	0,9076
0,0767±0,0009	0,0750±0,0001	0,9593

O teor total de flavonoides, expresso em equivalentes de catequina, foi igualmente determinado por espectrofotometria, tendo-se igualmente comparado os resultados obtidos pela utilização do espectrofotômetro de feixe duplo e o leitor de microplacas (Tabela 3). À semelhança dos fenóis totais, verificou-se a inexistência de diferenças estatisticamente significativas pela aplicação do teste *t-Student* ($p>0,05$). Desta forma, todas as restantes

determinações foram realizadas no leitor de microplacas. A Figura 19 apresenta uma das curvas de calibração obtidas para os padrões de catequina utilizando o leitor de microplacas, calculada com base na absorvância a 510 nm.

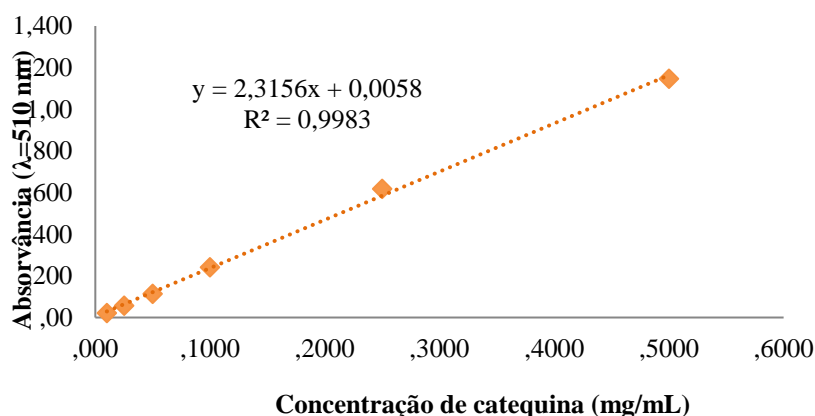


Figura 19. Curva de calibração para a determinação de flavonoides totais.

Tabela 3. Resultados de absorvância ($\lambda=510$ nm) obtidos na análise de flavonoides totais para diferentes diluições da mesma amostra, sendo as leituras realizadas em diferentes equipamentos.

Espectrofotômetro	Leitor de placas	teste <i>t-Student</i> valor- <i>p</i>
0,2990±0,0005	0,2830±0,0001	0,5957
0,1630±0,0009	0,1560±0,0001	0,1950
0,0750±0,0006	0,0770±0,0002	0,3739

Na Tabela 4 apresenta-se os resultados obtidos para a determinação dos fenóis totais e flavonoides totais para os extratos hidroetanólicos e decocção das folhas da *Satureja montana*. Os resultados apresentam-se como a média de experiências independentes, e desvio padrão associado, tendo sido efetuadas em triplicado.

Tabela 4. Determinação dos compostos fenólicos totais e flavonoides totais estudados nas amostras de *Satureja montana*.

Extratos	Fenólicos totais (mg EAG/g extrato)	Flavonoides totais (mg ECat/g extrato)
Decocção	214,9±8,5	220,2±15,5
Hidroetanólico	147,6±8,9	172,6±6,5

EAG: equivalentes de ácido gálico; ECat: equivalentes de catequina.

A concentração superior de compostos fenólicos e flavonoides totais foi obtida na amostra do extrato decocção, tendo-se obtido 214,9 mg EAG/g de extrato e 220,2 mg ECat/g de extrato, respetivamente. Este resultado indica que a preparação de infusões com a planta medicinal em estudo permite extrair uma quantidade elevada de compostos bioativos, pelo que o seu consumo pode ser benéfico para a saúde.

No estudo feito por Jovana *et al.* (2015), a quantidade total de fenóis no extrato aquoso de *Satureja montana* foi de 53,96±3,9 mg/g e os flavonoides foram encontrados numa quantidade de 0,36±0,01 mg/g. No entanto, segundo Tahirović *et al.* (2014), a quantidade total de fenóis em *Satureja montana* preparada na forma de infusão de “chá de ervas” foi de 78,5±23,49 mg/g. Por outro lado, Chrpová *et al.* (2010), reportaram uma quantidade menor de fenóis totais (27,1 mg/g). As diferentes quantidades de substâncias ativas encontradas confirmam que a composição química das plantas depende de vários fatores, tais como a estação em que foram colhidas, da área geográfica onde são colhidas, solo, e fatores climáticos, tais como as temperaturas ambientais prevaletentes durante o crescimento das plantas (Ramanauskienė *et al.*, 2009).

4.2 Bioatividade

4.2.1 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi avaliada utilizando três métodos *in vitro* distintos, o ensaio da captação do radical DPPH, a avaliação do poder redutor e a descoloração do β -caroteno.

O DPPH é um radical estável que perde a sua cor roxa quando aceita um eletrão de uma substância antioxidante. O ensaio de DPPH oferece um método conveniente, preciso e

simples de screening da atividade captadora de radicais livres de extratos de produtos naturais. No ensaio para a determinação do poder redutor, a presença de compostos antioxidantes na amostra determina a redução de Fe^{3+} para a forma ferrosa. Esta redução é realçada pela medição espectrofotométrica da intensidade do azul prussiano obtido, o que depende da capacidade de redução do extrato.

O último método utilizado para a avaliação antioxidante foi a inibição da descoloração do β -caroteno. Este método permite avaliar a capacidade que uma determinada substância tem de prevenir a oxidação do β -caroteno, protegendo-o dos radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico a 50 °C.

Na Tabela 5 apresentam-se os resultados obtidos pela aplicação dos métodos referidos.

Tabela 5. Resultados da atividade antioxidante (valores de EC50, mg/mL) determinada pelos diferentes métodos.

AMOSTRA	DPPH^a	Poder Redutor^b	Inibição da descoloração do β-caroteno^c
Extrato decocção	0,13 ±0,02	0,12 ±0,02	7,13 ±0,12
Extrato hidroetanólico	0,17±0,00	0,29±0,06	7,74±0,25
Trolox	0,04±0,00	0,07±0,04	0,64±0,01

Valores expressos como média ± desvio padrão de duas réplicas; ^a EC50 - Concentração para uma captação do radical DPPH de 50%; ^b EC50 - Concentração efetiva na qual a absorvância é 0,5; ^c EC50 - Concentração correspondente a 50% de descoloração em comparação com o sistema de referência (branco).

As amostras mostraram atividade de captação de radicais livres, que foi superior para decocção comparativamente ao extrato hidroetanólico, o que está de acordo com o teor mais elevado de fenóis totais e de flavonoides observado neste extrato (Tabela 4). Na Figura 20 apresenta-se a curva de percentagem de inibição do radical DPPH para os dois diferentes extratos e o Trolox, como composto padrão. Neste gráfico pode-se observar que conforme as concentrações aumentam, a atividade de captação do radical DPPH aumenta

também como seria esperado. Os resultados obtidos confirmam os dados apresentados por diversos estudos, que demonstram que a capacidade antioxidante é dependente do teor de compostos fenólicos presentes nos extratos de produtos naturais (Miceli *et al.*, 2009). A diferença observada para os resultados dos dois extratos no que respeita à atividade antioxidante avaliada pelo método do DPPH pode estar relacionada com o elevado teor de ácidos fenólicos, como o ácido rosmarínico e os seus derivados, descritos em *Satureja montana*. Estes compostos são solúveis em soluções aquosas e possuem uma elevada capacidade de eliminar radicais devido aos seus grupos hidroxilo fenólicos (Oke *et al.*, 2009).

Segundo o estudo de Kondo *et al.*, (2002), as propriedades antioxidantes dos extratos bioativos de *Satureja montana* foram avaliadas por eliminação do radical DPPH, sendo que o óleo essencial apresentou a menor capacidade antioxidante (508,5 µg/mL), seguido pelo extrato etanólico (108,8 µg/mL), o extrato preparado com água fria (27,9 µg/mL) e o extrato preparado com água quente (9,7 µg/mL).

De forma similar, Cavar *et al.*, (2008) observou um maior EC50 para o óleo essencial de *Satureja montana*, provavelmente devido aos níveis elevados de sesquiterpenos, que são conhecidos por apresentar uma baixa atividade antioxidante.

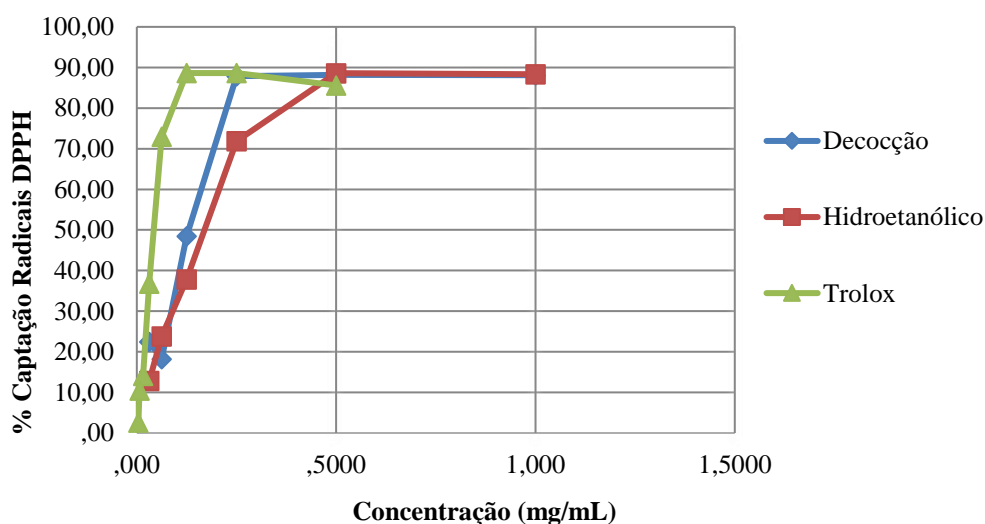


Figura 20. Percentagem de inibição do radical DPPH de diferentes concentrações de extrato aquoso e extrato hidroetanólico de *Satureja montana*.

Os resultados obtidos para o ensaio do poder redutor são concordantes com os do DPPH, evidenciando igualmente uma maior capacidade antioxidante para o extrato decocção comparativamente ao hidroetanólico.

Os resultados obtidos para o ensaio do poder redutor podem ser visualizados no gráfico da Figura 21, observando-se uma diferença mais notória entre os dois extratos comparativamente à verificada no ensaio anterior.

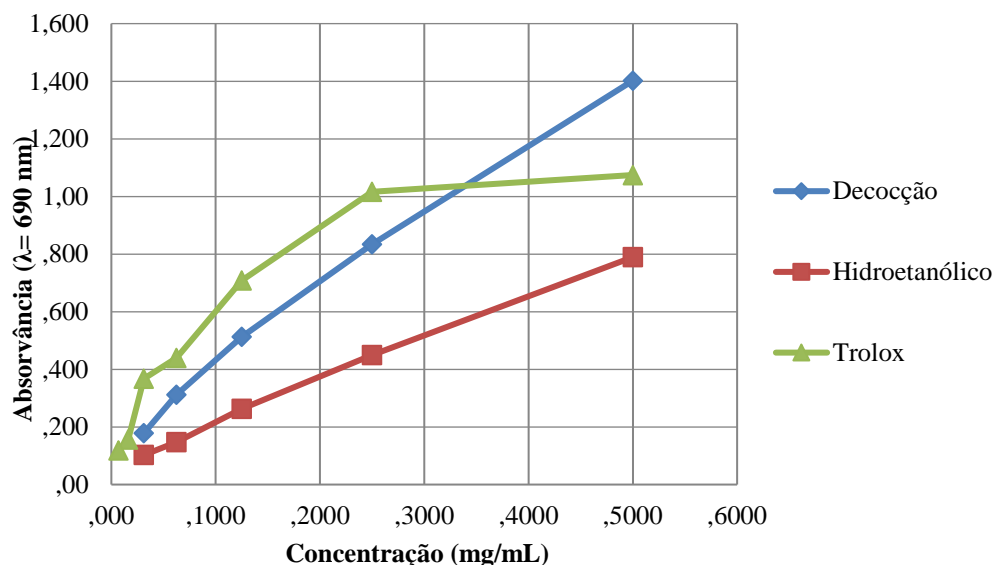


Figura 21. Resultado da avaliação do poder redutor para diferentes concentrações de extrato aquoso e hidroetanólico de *Satureja montana*.

O último método utilizado para a avaliação da atividade antioxidante foi a inibição da descoloração do β -caroteno. Este método permite avaliar a capacidade que uma determinada substância tem de prevenir a oxidação do β -caroteno, protegendo-o dos radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico a 50 °C. A reação pode ser monitorizada espectrofotometricamente pela perda da coloração do β -caroteno a 470 nm, com leitura no tempo 0 segundos e 2 horas. Contrariamente ao ensaio do DPPH, que utiliza um radical livre que não existe nas células de seres vivos, este ensaio traduz um sistema químico mais próximo ao existente nas células. Apesar dos resultados obtidos serem similares para os dois extratos em estudo, também neste ensaio se verificou que a decocção apresentou uma maior capacidade antioxidante comparativamente ao extrato hidroetanólico.

4.2.2 Atividade antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana é uma determinação complexa e pode variar devido a múltiplas variáveis tais como o meio de cultura utilizado, a concentração do inóculo, a metodologia utilizada, o método de extração usado, entre outros (Tajkarimi *et al.*, 2010). Na maioria dos trabalhos, a atividade antimicrobiana é quantificada com base na concentração mínima inibitória (MIC) ou concentração mínima bactericida (MBC). Inicialmente, o estudo da atividade antimicrobiana focou-se nos óleos essenciais da planta (comercial e extraído em Clevenger), uma vez que de entre as diversas propriedades descritas de uma maneira geral para os óleos essenciais, a atividade antimicrobiana é das mais referidas (Burt *et al.*, 2004). Por este motivo, para além de serem usados por diferentes indústrias, tais como cosmética, perfumes, farmacêutica e agroalimentar, a utilização de óleos essenciais ou plantas contendo óleos essenciais é também associada à medicina tradicional. Inicialmente, a atividade antibacteriana dos dois óleos essenciais foi avaliada pelo ensaio da difusão em ágar, tendo-se medido o halo de inibição após a incubação das placas (Tabela 6). Os resultados demonstraram que ambos os óleos essenciais possuem atividade antibacteriana, de uma forma geral sendo esta superior para o óleo essencial extraído em Clevenger. Curiosamente, para as bactérias Gram-negativo *P. aeruginosa* e *P. mirabilis*, não se verificou qualquer atividade ou esta foi mínima para este óleo, ao passo que o óleo essencial comercial conseguiu inibir, ainda que moderadamente, estas bactérias. Para as restantes bactérias, os halos de inibição variaram entre 20 e 35 mm para o óleo essencial Clevenger comparativamente a uma atividade muito inferior para o óleo essencial comercial, com halos entre 12 e 16 mm. De acordo com a classificação sugerida por Ponce *et al.* (2003), baseada no diâmetro dos halos de inibição, nomeadamente: resistente (-) para diâmetro <8 mm; sensível (+) entre 9-14 mm, muito sensível (++) entre 15-19 mm e extremamente sensível para diâmetro >20 mm, conclui-se que a maioria das bactérias foi extremamente sensível face ao óleo Clevenger e apenas sensível ou muito sensível face ao óleo comercial.

Tabela 6. Diâmetros da zona de inibição (mm) obtidos nos ensaios de atividade antimicrobiana face a distintos microrganismos.

Microrganismo	OE CLEV	OE OC
<i>Staphylococcus aureus</i>	30	13
<i>Bacillus cereus</i>	25	14
<i>Bacillus subtilis</i>	20	13
<i>Enterococcus faecalis</i>	35	14
<i>Escherichia coli</i>	32	14
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	30	12
<i>Enterobacter aerogenes</i>	34	16
<i>Proteus mirabilis</i>	14	14
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7	14

Como já foi referido anteriormente, no presente estudo a avaliação da MIC e MBC para os óleos essenciais foi feita através do método da macrodiluição em caldo, tendo-se utilizado as mesmas quatro bactérias Gram-positivo e cinco Gram-negativo e adicionalmente uma levedura (*Candida albicans*) frequentemente descrita como um microrganismo oportunista, associada a diferentes patologias. Apesar de mais laboriosa e demorada execução quando comparada com o método de microdiluição em caldo, optou-se pela utilização desta metodologia devido ao tipo de amostra. Para a realização desta avaliação, alguns autores optam por diluir o óleo essencial em solventes orgânicos, como etanol ou dimetilsulfóxido, mas ambos podem afetar a viabilidade celular alterando os resultados. Por outro lado, mesmo utilizando estes solventes, por vezes a solubilidade do óleo essencial é assim mesmo baixa, diminuindo quando a amostra é adicionada ao meio de cultura/meio. A utilização de um agente tensioativo, como o Tween 80, permite emulsionar o óleo essencial diretamente no meio de cultura aquoso. Adicionalmente, a realização do teste em tubos de ensaio permite a utilização de um volume superior bem como uma homogeneização vigorosa da amostra no meio de cultura (pela utilização de vortex) permitindo a obtenção de uma emulsão visualmente estável e de aspeto homogéneo. A

utilização de microplacas não permite realizar a referida homogeneização vigorosa, o que poderia comprometer a obtenção da concentração correta aquando da realização das diluições seriadas.

A Tabela 7 apresenta os resultados da MIC e MBC obtidas face às diferentes bactérias e levedura testada. Como observado no teste de screening em placas de agar, verificou-se que a amostra do óleo essencial extraída em Clevenger apresentou melhores resultados perante a maioria dos microrganismos testados, à exceção de *P.aeruginosa* para a qual se obteve resultados idênticos com os dois óleos. Os valores de MIC variaram entre 0,08% e 2,5% para óleo Clevenger e entre 1,25% e 2,5% para o óleo comercial. Verificou-se ainda que para a maioria das bactérias e óleos testados a MIC e MBC apresentaram valores idênticos, contudo sendo a MBC superior em alguns casos.

Os resultados obtidos estão de acordo com os previamente reportados no estudo realizado por Marin *et al.*, 2012, que demonstrou que o óleo essencial de *Satureja montana* proveniente da montanha Biokovo (Croácia) apresenta atividade antimicrobiana face a diversas bactérias, em particular no que respeita às bactérias Gram-positivo *B. subtilis*, *S. epidermidis* e *Listeria innocua*. De forma similar, neste estudo *P. aeruginosa* foi a bactéria que apresentou a MIC mais elevada (50 µL/poço de microplaca). De uma forma geral, *P. aeruginosa*, é frequentemente associada a um alto nível de resistência a diferentes antibióticos, o que para além de outros fatores pode estar relacionado com uma membrana externa restritiva existente em bactérias Gram-negativo (Bezić *et al.*, 2005; Mann *et al.*, 2000). De facto, segundo a literatura, os óleos essenciais tendem a ser mais ativos face a bactérias Gram-positivo do que negativo, devido à sua membrana externa que restringe a difusão de compostos hidrofóbicos através da camada de lipopolissacarídeos (Dhifi *et al.*, 2016). Devido à sua hidrofobicidade, pensa-se que diversos compostos presentes em óleos essenciais apresentam um elevado coeficiente de partilha nos lípidos da membrana celular de bactérias, afetando a sua estrutura e conduzindo a um aumento de permeabilidade com consequente perda de iões e moléculas importantes para a bactéria. No entanto, apesar do valor de MIC mais baixo ter sido obtido para *B. cereus*, uma bactéria Gram-positivo, neste trabalho não se verificou uma diferença muito notória entre as MIC obtidas para bactérias Gram-positivo e negativo.

A diferença de resultados observada para os dois óleos essenciais avaliados, relaciona-se muito provavelmente com a diferente composição apresentada pelos mesmos, com particular ênfase para o composto maioritário (carvacrol no óleo Clevenger e timol no

comercial). Segundo a literatura, óleos essenciais contendo elevados teores de aldeídos ou fenóis, tais como cinamaldeído, citral, carvacrol, eugenol ou timol, apresentam caracteristicamente uma elevada atividade antimicrobiana, seguindo-se óleos ricos em álcoois terpênicos (Dorman *et al.*, 2000; Lambert *et al.*, 2001). Segundo Lambert *et al.* (2001) a atividade de carvacrol e timol face a *B. cereus*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* é similar. Assim, a diferença de atividade entre os dois óleos poderá ser devida a um teor mais elevado de carvacrol (50,4%) no óleo Clevenger quando comparado com o comercial (timol 28,2% + carvacrol 4% = 32,2% total dos isómeros). No entanto, refira-se que todos os compostos presentes na mistura podem efetivamente contribuir para a atividade das amostras, uma vez que é sabido que alguns compostos quando presentes em misturas podem originar fenómenos sinérgicos (Dhifi *et al.*, 2016). Desta forma, futuramente seria interessante avaliar a atividade antimicrobiana para o carvacrol e o timol, isoladamente e em quantidades idênticas às encontradas em ambas as amostras estudadas. De igual forma, seria interessante avaliar a existência de eventuais sinergias entre este óleo essencial e determinados antibióticos, como uma abordagem alternativa face a diversas estirpes de bactérias cuja resistência a antibióticos tem sido crescente.

Por último, refira-se que, face aos resultados obtidos, o óleo essencial de *S. montana* mostra-se bastante promissor para ser utilizado como conservante/antimicrobiano quer em preparações cosméticas, como a nível da indústria agroalimentar, indo ao encontro da tendência atual de utilizar conservantes provenientes de produtos naturais em detrimento de compostos sintéticos.

Tabela 7. Concentração mínima inibitória (MIC), bactericida (MBC) e fungicida (MFC, para *C.albicans*) dos óleos essenciais de *Satureja montana* (CLEV, Clevenger; OC, comercial).

Microrganismos	MIC		MBC/MFC	
	OE CLEV	OE OC	OE CLEV	OE OC
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,3125%	2,5%	0,16%	2,5%
<i>Bacillus cereus</i>	0,078%	2,5%	0,078%	2,5%
<i>Bacillus subtilis</i>	0,16%	1,25%	0,16%	1,25%
<i>Enterococcus faecalis</i>	0,16%	2,5%	0,3125%	2,5%
<i>Escherichia coli</i>	0,16%	2,5%	0,16%	2,5%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,16%	1,25%	0,3125%	1,25%
<i>Enterobacter</i>	0,3125%	2,5%	0,3125%	2,5%
<i>Proteus mirabilis</i>	0,16%	2,5%	0,16%	2,5%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,5%	2,5%	2,5%	2,5%
<i>Candida albicans</i>	0,16%	1,25%	0,16%	1,25%

4.3 Incorporação do extrato no hidrogel

A utilização de compostos antioxidantes em formulações dérmicas tem como objetivo a proteção da pele contra danos oxidativos causados pela radiação UV. Desta forma, compostos naturais como os flavonoides, que têm a capacidade de absorver radiação deste tipo, são potenciais candidatos a serem incorporados nas formulações referidas. De facto, existem evidências que a aplicação tópica destes compostos, com propriedades de captação de radicais livres, pode proteger os tecidos de danos oxidativos (Meenakshi *et al.*, 2006). Por outro lado, é expectável que eventuais defeitos colaterais originados pelo seu uso, sejam inferiores aos causados por produtos sintéticos (Barreira *et al.*, 2013). Por este motivo, a utilização de plantas medicinais em produtos de dermocosmética tem vindo a aumentar nas últimas décadas. No entanto, apesar de existirem diversos estudos sobre a avaliação de propriedades biológicas de extratos de plantas, são escassos os trabalhos relativos à sua avaliação nas formulações finais.

Com vista a avaliar o potencial de *S. montana* para ser usada na indústria cosmética/farmacêutica, neste trabalho procedeu-se ainda à elaboração de um hidrogel para aplicação tópica na pele. Adicionalmente, a utilização de géis tem-se tornado popular devido à sua facilidade de aplicação e melhor absorção percutânea quando comparada com outras preparações semissólidas, entre outros fatores (Haneefa *et al.*, 2010). Tratando-se de uma matriz de base aquosa, optou-se por avaliar apenas a adição dos extratos solúveis, nomeadamente a decoção e extrato hidroetanólico. Na Figura 22 apresenta-se um exemplo dos hidrogéis preparados.



Figura 22. Imagem dos géis hiddrossolúveis preparados.

No presente trabalho, selecionou-se o carbopol 940 como polímero para a gelificação e obtenção dos hidrogéis uma vez que este polímero é facilmente disperso em água, não é oleoso e permite a incorporação de princípios ativos hidrossolúveis (Lubrizol, 2009; Barreira *et al.*, 2013). Adicionalmente refira-se que é um polímero muito usado pela indústria, não apenas para obter géis de base aquosa, mas também géis hidroalcoólicos, sendo um dos mais usados para a produção de géis antissépticos para desinfeção de mãos (Lubrizol, 2009), atualmente com grande procura devido ao vírus SARS-COV-2.

Assim, neste trabalho procedeu-se à incorporação dos extratos de *S. montana* no hidrogel, tendo-se usado uma quantidade de forma a obter uma concentração similar à descrita por Barreira *et al* (2013), nomeadamente 100 µg extrato/mL gel. Os hidrogéis foram preparados por adição de um volume de concentração conhecida dos extratos a uma quantidade final conhecida de hidrogel. Posteriormente, por gravimetria calculou-se a concentração em µg extrato/mL gel. Os hidrogéis obtidos foram então avaliados no que respeita ao seu potencial antioxidante e antimicrobiano.

Inicialmente, procedeu-se à determinação do teor total em compostos fenólicos totais, tendo-se analisado os hidrogéis preparados. Tendo-se obtido valores de absorvância muito elevados, verificou-se que os mesmos estavam fora da gama de leitura do equipamento. Desta forma, procedeu-se à sua diluição seriada com água destilada sendo os resultados de absorvância obtidos apresentados na Figura 23.

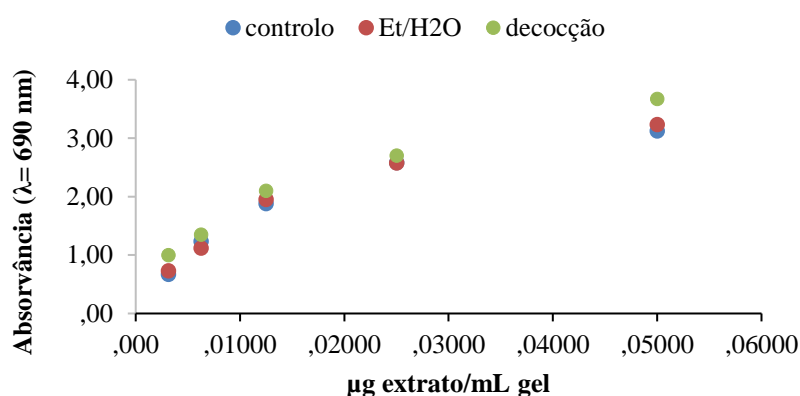


Figura 23. Resultados de absorvância obtidos para a determinação de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu.

Como se pode observar na Figura 23, de uma forma geral, verifica-se uma absorvância elevada para o gel controlo o que sugere que algum componente (s) do mesmo reage (m) com o reagente de Folin-Ciocalteu, o que foi visível pela cor azul escura intensa obtida. No entanto, verifica-se que a adição dos extratos permite obter absorvâncias ligeiramente superiores, principalmente no caso da adição do extrato obtido por decocção. Este resultado é coerente com o obtido para a determinação de fenóis totais (Tabela 4) uma vez que este extrato apresentou uma concentração superior comparativamente com o extrato hidroetanólico. No caso dos flavonoides, para verificação da presença destes compostos no hidrogel, procedeu-se apenas à leitura de absorvância do ponto de maior concentração avaliado para os fenóis totais (Figura 23). Verificou-se que o valor lido para o gel controlo ($0,054 \pm 0,002$) foi idêntico à do branco de reação feito com a adição de água ($0,051 \pm 0,006$), denotando a ausência de flavonoides, como seria de esperar. Também como expectável, foram obtidas absorvâncias ligeiramente superiores para o hidrogel adicionado com o extrato decocção ($0,118 \pm 0,013$) comparativamente ao adicionado com o extrato hidroalcoólico ($0,105 \pm 0,004$), o que confirma a presença destes compostos no hidrogel devido à adição dos extratos.

Os resultados da atividade antioxidante avaliada pelos ensaios de DPPH e poder redutor apresentam-se na Tabela 8.

Tabela 8. Resultados da atividade antioxidante (valores de EC50, mg de extrato/mL hidrogel) determinada pelos diferentes métodos.

Amostra	DPPH	Poder redutor
Hidrogel incorporado com extrato decocção	$0,049 \pm 0,002$	$0,029 \pm 0,008$
Hidrogel incorporado com extrato hidroetanólico	$0,095 \pm 0,007$	$0,045 \pm 0,001$

Valores expressos como média \pm desvio padrão de duas réplicas; ^a EC50 - Concentração para uma captação do radical DPPH de 50%; ^b EC50 - Concentração efetiva na qual a absorvância é 0,5.

Verificou-se que ambos os hidrogéis preparados com os extratos de Segurelha apresentaram atividade antioxidante, para os ensaios realizados. Os resultados obtidos estão de acordo com a composição verificada para ambos os extratos no que concerne ao seu teor

em compostos bioativos (Tabela 5), uma vez que o extrato decocção demonstrou conter um teor superior em compostos fenólicos totais e em flavonoides totais, os quais como referido anteriormente são frequentemente associados a propriedades antioxidantes. Refira-se ainda que, no caso do ensaio de captação do radical DPPH, o hidrogel formulado pela incorporação do extrato decocção permitiu obter uma inibição de 64% do radical enquanto o hidrogel contendo extrato hidroetanólico permitiu apenas obter uma inibição de 52%. Comparativamente com os resultados dos mesmos ensaios realizados para os extratos, os respetivos hidrogéis apresentam um desempenho em termos de atividade antioxidante algo superior, o que poderá estar associado a alguns dos componentes adicionados na formulação. Os resultados obtidos estão ainda em linha com os reportados previamente por Barreira *et al.*, (2013), que verificou que a atividade antioxidantes de hidrogéis preparados de forma similar aos deste trabalho, mas contendo extratos aquosos ou hidroetanólico de frutos de *Crataegus monogyna*, apresentavam valores semelhantes ou superiores aos dos respetivos extratos.

Adicionalmente, procedeu-se à avaliação da atividade antimicrobiana dos hidrogéis adicionados com os dois extratos de Segurelha. Para este ensaio, optou-se por utilizar a técnica da microdiluição em caldo, uma vez que ambos os extratos são hidrossolúveis. Assim, preparou-se uma solução aquosa com concentração conhecida para cada um dos extratos, as quais foram incorporadas durante a preparação do hidrogel. Os resultados obtidos, apresentam-se na Tabela 9. Pode-se observar que, à exceção da bactéria *P. aeruginosa*, verificou-se que os hidrogéis apresentaram atividade antimicrobiana para todas as restantes bactérias testadas. De uma maneira geral, a incorporação do extrato hidroetanólico permitiu obter valores de MIC e MBC inferiores comparativamente à decocção. Tal pode estar relacionado com a composição individual de compostos nos extratos, pelo que seria necessário realizar a análise destes através de outras metodologias. Entre as espécies testadas, é de destacar o caso de *S. aureus*, uma bactéria que se encontra frequentemente na pele podendo, por exemplo, originar infeções de feridas. Para ambos os hidrogéis foram obtidos valores bastante baixos de MIC e MBC, particularmente no caso daquele adicionado com extrato hidroetanólico para o qual se verificou um valor cerca de 3,5 vezes superior ao do antibiótico usado como controlo positivo neste trabalho (uma cefalosporina de 3ª geração de largo espetro de ação). Já para o caso de *P. aeruginosa*, verificou-se que esta bactéria foi resistente para a maior concentração testada da incorporação de ambos os extratos (cerca de 100 µg/mL).

Considerando os resultados globais obtidos, estes sugerem que a adição de extratos de segurelha confere propriedades antioxidantes e antimicrobianas ao hidrogel final, pelo que esta abordagem demonstra potencial como alternativa à utilização de antioxidantes e/ou conservantes sintéticos neste tipo de produtos.

Tabela 9. Resultados da avaliação da atividade antimicrobiana ($\mu\text{g/mL}$) dos hidrogéis adicionados de extrato hidroetanólico e decocção de *Segurelha* e dos compostos usados como controlo positivo.

Microrganismos	MIC		MBC		MIC		MBC	
	Decocção	HidroEt	Decocção	HidroEt	Cefotaxima	Nisina	Cefotaxima	Nisina
<i>Staphylococcus aureus</i>	12,8	6,3	12,8	6,3	1,8	450	1,8	450
<i>Bacillus cereus</i>	6,4	101,5	6,4	101,5	SI	450	> 59	450
<i>Bacillus subtilis</i>	102	50,8	102	50,8	< 0,46	> 450	< 0,46	> 450
<i>Enterococcus faecalis</i>	102	50,8	102	50,8	< 0,46	450	< 0,46	450
<i>Escherichia coli</i>	102	50,8	102	101,5	< 0,46	> 450	< 0,46	> 450
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	51	101,5	51	101,5	< 0,46	< 3,5	< 0,46	< 3,5
<i>Enterobacter</i>	51	12,7	102	101,5	0,9	> 450	0,9	> 450
<i>Proteus mirabilis</i>	102	12,7	102	25,4	<0,46	> 450	<0,46	> 450
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	SI	SI	SI	SI	14,8	> 450	14,8	> 450

5. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

Ultimamente, nos países desenvolvidos, tem-se verificado, por parte dos consumidores em geral, uma tendência crescente de estarem informados e um maior interesse por questões éticas, ambientais, de sustentabilidade, de preservação e manutenção da saúde, entre outras, relacionadas com os produtos que adquirem e consomem. Tal verifica-se não apenas nos produtos alimentares, mas também em produtos de higiene e cosmética, entre outros. Em ambos os casos, esta faixa de consumidores procura cada vez mais obter produtos que tenham a adição de compostos ou extratos obtidos de fontes naturais em detrimento da adição de compostos sintéticos. Neste ponto, a utilização de plantas aromáticas, muitas vezes usadas também em medicina tradicional, apresenta-se como uma potencial alternativa. Tal deve-se sobretudo ao facto destas plantas conterem compostos provenientes do seu metabolismo secundário, tais como terpenos e uma diversidade de compostos fenólicos, que apresentam uma atividade biológica interessante. Este trabalho incidiu numa planta aromática ainda pouco estudada quando comparada com outras de conhecimento mais geral. Em Portugal, esta planta é usada sobretudo na gastronomia da região sul, não sendo muito conhecida do público em geral, tratando-se, contudo, de uma planta também usada na medicina tradicional. Para além da planta seca destinada à preparação de infusões, encontra-se também disponível comercialmente o seu óleo essencial. Os óleos essenciais apresentam geralmente uma composição complexa e estão descritos como tendo uso potencial em várias áreas, incluindo na saúde, área alimentar, cosmética e perfumaria. Nomeadamente, têm sido realizados estudos com diversos óleos essenciais no que respeita à sua atividade antimicrobiana, com vista à sua exploração em diferentes áreas. Assim, procedeu-se à caracterização da composição química por GC-MS e da atividade antimicrobiana do óleo essencial extraído laboratorialmente de uma amostra seca de *S. montana* e de uma amostra comercial de óleo essencial. Ambos os óleos apresentaram atividade antimicrobiana face às bactérias testadas, tendo sido obtidos melhores resultados para o óleo extraído laboratorialmente. Tal estará muito provavelmente relacionado com a sua diferente composição, nomeadamente o facto de apresentar um teor elevado de carvacrol (50,4%), um monoterpene fenólico ao qual tem sido associada uma elevada atividade antimicrobiana. Desta forma, e considerando que matrizes naturais apresentam frequentemente uma variabilidade elevada no que respeita à sua composição química

(devido a fatores edafoclimáticos, entre outros), conclui-se ser relevante a análise da composição química deste tipo de amostra. O óleo essencial de *S. montana* demonstrou um potencial elevado para ser usado com finalidades antimicrobianas, por exemplo na área alimentar, farmacêutica ou cosmética. No que respeita a esta última, como trabalho futuro seria interessante proceder à sua incorporação numa matriz cosmética, por exemplo num creme obtido por emulsão óleo/água, e avaliar a atividade antimicrobiana conferida, bem como a estabilidade e propriedades organolépticas (cor, cheiro e textura) do produto obtido.

Foi ainda avaliada a composição de dois tipos de extratos hidrossolúveis de diferentes polaridades preparados a partir da mesma amostra de planta seca usada na extração do óleo essencial, nomeadamente um extrato hidroetanólico (80% etanol, v/v) e um extrato aquoso obtido por decocção. Verificou-se que a decocção permitiu obter um teor total mais elevado de compostos fenólicos e de flavonoides, apresentando igualmente atividade antioxidante superior. Estes extratos foram posteriormente incorporados numa formulação de um hidrogel, procedendo-se à avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana dos hidrogéis contendo os extratos. Os resultados obtidos sugerem que a adição dos extratos de *S. montana* confere propriedades antioxidantes e antimicrobianas ao produto final. Contudo, são necessários estudos adicionais para confirmar esta hipótese, nomeadamente procedendo-se à preparação de um hidrogel com uma formulação mais simples. Futuramente, seria também interessante estudar a existência de possíveis fenómenos sinérgicos no que respeita à atividade antimicrobiana.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amarowicz, R., Pegg, R.B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., Weil, J.A., (2004). Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*, v. 84, p.551-562.
- Angelo, P. M., Jorge, N., (2007). Phenolic compounds in foods - A brief review. *Ver Inst Adolfo Lutz*, v. 66 (1), p.232-240.
- Atoui, A. K., Mansouri, A., Boskou, G., Kefalas, P., (2005). Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*, v. 89 p.27–36.
- Azar, A. D., Murkcuoglu, M., Satil, F., Baser, K. H. C., Tumen, G., (2005). In vitro antimicrobial activity and chemical composition of some *Satureja* essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, Chichester, v. 20, p.587-591.
- Bakhouche, A., Lozano, S. J., Beltrán, D. R., Joven J., Segura, C. A., Fernández, G. A., (2013). Phenolic characterization and geographical classification of commercial Arbequina extra-virgin olive oils produced in southern Catalonia. *Food Research International*, v. 50, p.401- 408.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, v.46, p.446–475.
- Barreira, J. C. M., (2010). Caracterização Biológica, Química e Nutricional de *Castanea Sativa* Miller e *Prunus Dulcis* (Miller) D.A. Webb. Tese de Doutoramento em Ciências Farmacêuticas – Nutrição e Química dos Alimentos. Faculdade de Farmácia, – Universidade do Porto, Porto. p.225.
- Barreira, J. C. M., Rodrigues, S., Carvalho, A. M., Ferreira, I. C. F. R., (2013). Development of hydrosoluble gels with *Crataegus monogyna* extracts for topical application: Evaluation of antioxidant activity of the final formulations. *Industrial Crops and Products*, v. 42, p.175-180.

- Barroso, M. F., Noronha, J. P., Delerue, M. C., Oliveira, M. B. P. P., (2011). Flavored waters: influence of ingredients on antioxidant capacity and terpenoid profile by HS-SPME/GC-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 59, p.5062-5072.
- Bezbradica, D. I., Tomovic, J. M., Vukasinovic, M. S., Silermarinkovic, S., (2005). Composition and antimicrobial activity of essential oil of *Satureja montana* L. collected in Serbia and Montenegro. *Journal of Essential Oil Research, Carol Stream*, v. 17, p.462-465.
- Bezić, N., Skocibusić, M., Dunkić, V., (2005). Phytochemical composition and antimicrobial activity of *Satureja montana* L. and *Satureja cuneifolia* Ten. *Essential oils*. p.313-322.
- Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y., Nasri, M. (2008). Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry*, v.114, p.1198-1205.
- Braca, A., Tommasi, N., Bari, L. D., Pizza, C., Politi, M., Morelli, I., (2001). Antioxidant principles from *Bauhinia tarapotensis*. *Journal of Natural Products*, v.64 p. 892-895.
- Bucar, F., Wube, A., Schmid, M., (2013). Natural product isolation: how to get from biological material to pure compounds. *Natural product reports*, v. 30, p. 525- 545.
- Burt, S., (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. *International Journal of Food Microbiology, Amsterdam*, v. 94, p.223-253.
- Camejo, R. J .S., (2001). Contributo para o Estudo Etnobotânico das Plantas Medicinais e Aromáticas no Parque Natural da Serra de S. Mamed. Relatório de Estágio para licenciatura em Biologia. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- Caprioli, G., Lupidi, G., Maggi, F., (2019). Comparison of chemical composition and antioxidant activities of two Winter savory subspecies (*Satureja Montana* subsp.

- Variegata and *Satureja Montana* subsp. *Montana*) cultivated in Northern Italy., v.33, p.3143-3147.
- Cassidy, A., Kay, C., (2013). Phytochemicals: Classification and Occurrence. In: Caballero B, Allen L, Prentice A. (Ed.). Encyclopedia of Human Nutrition. Third Edition. Elsevier, p.1388-1395.
- Ćavar, S., Maksimović, M., Solić, M.E., Mujkić, A.J., Besta, R., (2008). Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of two *Satureja* essential oils. Food Chemistry, Chicago, v. 111, n. 3, p.648-653.
- Četković, G. S., Mandić, A. I., Canadanović-Brunet, J. M., Djilas, S. M., Tumbas, V. T., (2007). HPLC screening of phenolic compounds in winter savory (*Satureja montana* L.) extracts. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, New York, v. 30, p.293-306.
- Chitarra, M. I. F., Chitarra, A. B., (2005). Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio. 2. ed. Lavras: UFLA, p.785.
- Chrpová, D., Kourimská, L., Gordon, M. H., Hermanová, V., Roubířková, I., Pánek, J., (2010). Antioxidant activity of selected phenols and herbs used in diets for medicinal conditions. Czech Journal of Food Sciences, v.28, p.317.
- Chung, Y. C., Chang, C. T., Chao, W. W., Lin, C. F., Chou, S. T., (2002). Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.50, p.2454-2458.
- Cicco, N., Lanorte, M. T., Paraggi, M., Viggiano, Lattanzio, V., (2009). A reproducible, rapid and inexpensive Folin-Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. Microchemical Journal, v.91, p.107-110.
- Costa, R., (2009). Avaliação do Potencial Antioxidante da Folha de *Cydonia oblonga* Miller. Monografia. Porto, Universidade Fernando Pessoa.

- Cowan, M. M., (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, v. 12, p.564-582.
- Croteau, R., Kutchan, T. M., Lewis, N. G., (2000). Secondary Metabolites. *Biochemistry Molecular Biology of Plants*, v. 7, p.1250–1318.
- Croteau, R., Kutchan, T. M., Lewis, N., (2000). Natural Products (Secondary Metabolites) apud BUCHANAN, B., GRUISSEM, W., JONES, R. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists. p.1250-1318.
- Crowell, P. L., Lin, S., Vedejs, E., Gould, M. N., (1992). Identification of metabolites of the antitumor agentd-limonene capable of inhibiting protein isoprenylation and cell growth. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, v. 31, p.205–212.
- Cunha, A. P., *et al.* (2012). *Plantas Aromáticas e Óleos Essenciais Composição e Aplicações*, Lisboa.
- Cunha, A. P., Ribeiro, J. A., Roque O. R., (2009). *Plantas Aromáticas em Portugal - Caracterização e Utilizações*. Fundação Calouste Gulbenkian. 2ª Ed. Lisboa.
- Dai, J., Mumper, R. J., (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, v.15, p.7313-7352.
- Damjanović, V. B., Perović, A., Suković, D., Perović, S., (2011). Effect of vegetation cycle on chemical content and antibacterial activity of *Satureja montana L.* *Arch. Biol. Sci.* v.63, p. 1173–1179.
- Dhifi, W., Bellili, S., Jazi, S., Bahloul, N., Mnif, W., (2016). Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review., *Sage journals* p.2-16.

- Djilani, A., Dicko, A., (2012). The therapeutic benefits of essential oils. INTECH Open Access Publisher.
- Dorman, H. J. D., Deans, S. G., (2000). Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* v.88, p.308–316.
- Dutta, B. K., (2007). Principles of mass transfer and separation process. New Delhi: Prentice-Hall of India Pvt.Ltd. E. (eds.) *Plant Physiology*. 5^a ed. E.U.A.: Sinauer Associates, Inc. p.369-400.
- Engelberth, J., (2010). Secondary Metabolites and Plant Defense. In: Taiz, L. & Zeiger, Friedman, M., (2007). Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas. *Molecular Nutrition & Food Research*, v.51, p.116- 134.
- Georgiev, V., Ananga, A., Tsoleva, V., (2014). Recent Advances and Uses of Grape Flavonoids as Nutraceuticals. *Nutrients*, v.6 p.391-415.
- Gil, M. G. S. B., Santos, M. A. J. C., Tavares, M. M. L., (2005). Produção de extractos na Indústria Alimentar: uso de fluidos supercríticos, Instituto Superior Técnico, Lisboa, Portugal.
- Gil, R. P., (2002). “Products naturales”; Universidad Publica de Navarra, Pamplona.
- Golmakani, M. T., Rezaei, K., (2005). Comparison of microwaveassisted hydrodistillation with traditional hydrodistillation method in the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris*, *Journal of Food Chemistry*.
- Guenther, E., (1955). *The essential oils*, v.1. New York: Fritzsche Brothers INC.
- Haneefa, M. K. P., Hanan, S. K., Saraswathi, R., Prasad, G. M., Chandini, N., (2010). Formulation and evaluation of herbal gel of *Pothos scandens* Linn, v. 3, p.988–992.

- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., Bobilya, D. J., (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v.13, p.572-584.
- Heldt, H., (1977). *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. Oxford: Oxford University Press, p.522.
- Ignat, I., Volf, I., Popa, V. I., (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, v.126 , p.1821-1835.
- Ikawa, M., Schaper, T. D., Dollard, C. A., Sasner, J. J., (2003). Utilization of Folin-Ciocalteu Phenol Reagent for the Detection of Certain Nitrogen Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* v. 51, p.1811-1815.
- Jovana, S., Popovic, A., Petrovic, M., Anackov, G., Bursic, V., Kiproviski, B., Prvulovic, D., (2015). Allelopathic effects and insecticidal activity of aqueous extracts of *Satureja montana* L., *Journal of the Serbian Chemical Society*, v.80, p.475-484.
- Karadag, A., Ozcelik, B., Saner, S., (2009). Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Analytical Methods*. V.2, p.41-60.
- Kondo, S., Tsuda, k., Muto, N., Ueda, J., (2002). Antioxidative activity of apple skin or fresh extracts associated with fruit development on selected apple cultivars. v. 96, p.177-185.
- Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P., Nychas, G. J. E., (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.* v. 91, p. 453–462.
- Lee, J. H., Ozcelik, B., Min, D. B., (2003). Electron donation mechanisms of betacarotene as a free radical scavenger. *Journal of Food Science*. v. 68, p.861-865.

- Luque de Castro, M. D., Priego-Capote, F., (2010). Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of chromatography. A*, v. 1217, p.2383–2389.
- Macelli, A., Vitanza, L., Imbriano, A., Frascetti, C., Filippi, A., Goldoni, P., Maurizi, L., Ammendolia, M. G., Crestoni, M. E., Fornarini, S., Menghini, L., Carafa, M., Marianecchi, C., Longhi, C., Rinaldi, F., (2020). *Satureja nontana L.* Essential Oils: Chemical Profiles/Phytochemical Screening, Antimicrobial Activity and O/W NanoEmulsion Formulations.
- Magalhães, L. M., Segundo, M. A., Reis, S., Lima, J. L. F. C., (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*. v.613, p.1-19.
- Mann, C. M., Cox, S. D., Markham, J.L., (2000). The outer membrane of *Pseudomonas alternifolia* (tea tree oil). *Letters in Applied Microbiology*, v. 30, p.294-297.
- Marin, M., Novaković, M., Tešević, V., Vučković, I., Milojević, N., Vuković, G. B., Petar, M., (2012). Antioxidative, antibacterial and antifungal activity of the essential oil of wild-growing *Satureja montana L.* from Dalmatia, Croatia. *Flavour Fragr.* v. 27, p.216-223.
- Mastelic, J., Jerkovic, I., (2003). Gas chromatography–mass spectrometry analysis of free and glycoconjugated aroma compounds of seasonally collected *Satureja montana L.* *Food Chem.* v.80, p.135–140.
- Meenakshi, S., Raghavan, G., Nath, V., Kumar, A. S. R., Shanta, M., (2006). Antimicrobial, wound healing and antioxidant activity of *Plagiochasma appendiculatum* Lehm.et Lind. *J. Ethnopharmacol.* v.107, p.67–72.
- Miceli, N., Trovato, A., Dugo, P., Cacciola, F., Donato, P., Marino, A., Ellinghieri, V. B., La barbera, T. M., Guvenc, A., Taviano, M. F., (2009). “Comparative analysis of flavonoid profile, antioxidant and antimicrobial activity of the berries of *Juniperus communis L. var. communis* and *Juniperus communis L. var. saxatilis* Pall. from

- Turkey.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, p.6570–6577.
- Momtaz, S., Abdollahi, M., (2010). An update on pharmacology of *Satureja* species; From antioxidant, antimicrobial, antidiabetes and anti-hyperlipidemic to reproductive stimulation. *Int. J. Pharmacol.* v. 6, p.454–461.
- Navarro-Rocha, J., Andrés, M. F., Díaz, C. E., Burillo, J., Coloma, G., (2020). Composition and biocidal properties of essential oil from pre- domesticated Spanish *Satureja Montana*. v.145.
- Oke F., Aslim B., Ozturk, S., Altundag S., (2009). Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja cuneifolia* Ten. *Food Chem* p.1874 – 879.
- Oliveira, R. B., Godoy, S. A. P., Costa, F. B., (2003). *Plantas tóxicas:conhecimento e prevenção de acidentes*. Ribeirão Preto: Editora Holos, p.64.
- Peterson, J., Dwyer, J., (1998). Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. *Nutrition Research*,v. 18, p.1995-2018.
- Ponce, A. G., Fritz, R.,Valle, C., Roura, S. I., (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard, *Food Science and Technology* v.36, p. 679-684.
- Prieto, J. M., Iacopini, P., Cioni, P., Chericoni, S., (2007). In vitro activity of the essential oils of *Origanum vulgare*, *Satureja montana* and their main constituents in peroxynitrite-induced oxidative processes. *Food Chemistry, London*, v. 104, p. 889-895.
- Prins, C. L., Lemos, C. S. L., Freitas, S. P., (2006). Efeito do tempo de extração sobre a composição e o rendimento do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*). *Revista Brasileira Plantas Medicinai*s. v.8, p.92-95.

- Prior, R. L., Wu, X., Schaich, K., (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.*, v.53, p.4290-4302.
- Radonic, A., Milos, M., (2003). Chemical composition and *in vitro* evaluation of antioxidant effect of free volatile compounds from *Satureja montana* L. *Free Radic. Res.* v.37, p.673–679.
- Ramanauskienė, K., Savickas, A., Inkėnienė, A., Vitkevičius, K., Kasparavičienė, G., Briedis, V., Amšiejus, A., (2009). *Medicina (Kaunas)*, v.45, p.712.
- Raut, J. S., Karuppayil, S. M., (2014). A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products*, v. 62, p. 250-264.
- Rodrigues, J. S. C., (2002). Contributo para o estudo etnobotânico das plantas medicinais e aromáticas na área protegida da serra do açor. APPSA, ICN, p.8.
- Salisbury, F. B., Ross, C. W., (1994). *Plant physiology*. 4^a Ed. Belmont: Wadsworth Inc., p.682.
- Serafini, L. A., Santos, A. C. A., Touguinha, L. A., Agostini, G., Dalfovo, V., (2002). Extrações e aplicações de óleos essenciais de plantas aromáticas e medicinais. *Caxias do Sul: EDUCS*.
- Sevarda, L. A., Kuznjecova, A. G., Pavlovic, S., Zivanovic, P., Jancic, R., (1986). Quantity and composition of essential oil and anatomic structure *Satureja montana* L. (*Lamiaceae*). *Pharmacy, Hertfordshire*, v. 36, p.167-175.
- Shylaja, M. R., Peter, K. V., (2004). The functional role of herbal spices. In: Peter, K. V. *Handbook of herbs and spices*. v.2 Cambridge: Woodhead Publishing Limited, p.360.
- Silva, F. V. M., Martins, A., Salta, J., Neng, N.R., Nogueira, J.M.F., Mira, D.,

- Gaspar, N., Justino, J., Grosso, C., Urieta, J.S., Palavra, A.S., Rauter, A.P., (2009). Phytochemical profile and Anticholinesterase and antimicrobial activities supercritical versus conventional extracts of *Satureja montana*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Easton, v. 57, p.11557-11563.
- Singh, B. *et al.* Phenolic compounds as beneficial phytochemicals in pomegranate (*Punica granatum L.*) peel: a review. *Food Chemistry*, v. 261, p.75-86, 2018.
- Skocibusic, M., Bezić, N., (2003). Chemical composition and antidiarrhoeal activities of winter savory (*Satureja montana L.*) essential oil. *Pharmaceutical Biology*, Lisse, v. 41, p.622-626.
- Slavkovska, V., Jancic, R., Bojovic, S., Milosavljevic, S., Djokovic, D., (2011). Variability of essential oils of *Satureja Montana L.* and *Satureja Kitaibelli Wier. ex Heuff* from the central part of the Balkan Peninsula. *Phytochemistry: Chemistry, Biochemistry, Molecular Biology*, New York, v. 57, p.71-76.
- Souza, S. M., *et al.* (2010). Óleos essenciais: aspetos económicos e sustentáveis. *Enciclopédia Biosfera*, v.6, p.1-11.
- Sučur, J., Popović, A., Petrović, M., Anačkov, G., Bursić, V., Kiprovska, B., Prvulović, D., (2015). Allelopathic effects and insecticidal activity of aqueous extracts of *Satureja montana L.* *Journal of the Serbian Chemical Society*, p.475-484.
- Tahirović, I., Kožljak, M., Toromanović, J., Čopra-Janićijević, J.A., Klepo, A., Topčagić, H., Demirović, B., (2014). *Chem. Technol. Bosnia Herzegovina*, v.42, p.51.
- Taiz, L., Zeigert, E., (2004). *Fisiologia Vegetal*. 3ª Ed. Porto Alegre: Artmed. p.719.
- Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A., Cliver, D. O., (2010) "Antimicrobial herb and spice compounds in food." *Food Control*, v.21, p.1199-1218.
- Theodore, L., Ricci, F., (2010). *Mass transfer operations for the practicing engineer*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.

- Van Geldre, E. A., Van Den Eeckhout, E., (1997). State of the art of the production of the antimalarial compound artemisinin in plants. *Plant Molecular Biology*, v. 33, p.199–209.
- Variagate and *Satureja Montana* subsp. *Montana*) cultivated in Northern Italy. v.33, p.3143-3147.
- Vinha, A. F., Ferreres, F., Silva, B. M., Valentão, P., Gonçalves, A., Pereira, J. A., Oliveira, M. B., Seabra, R. M., Andrade, P. B., (2005). Phenolic profiles of Portuguese olive fruits (*Olea europaea* L.): Influences of cultivar and geographical origin. *Food Chemistry*, v.89, p.561- 568.
- Vuolo, M. M., Lima, V. S., Junior, M. R. M., (2019). Phenolic Compounds: Structure, Classification, and Antioxidant Power. p.33-50.
- Wildung, M. R., Croteau, R. A., (1996). DNA clone for taxadiene synthase, the diterpene cyclase that catalyzes the committed step of taxol biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, v. 271, p.9201–9204.
- Wiseman, H., (2013). Phytochemicals: Health Effects. In: Caballero B, Allen L, Prentice A (Ed.). *Encyclopedia of Human Nutrition*. Third Edition. Elsevier, p.1396-1400.
- Yen, G. C., Chen, H. Y., (1995). Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *Journal Agricultural and Food Chemistry* v.43, p.27-32.
- Yusoff, Z. M., Nordin, M. N. N., Rahiman, M. H. F., Adnam, R., Taib, M. N., (2011). Characterization of Down-Flowing Steam Distillation System using Step Test Analysis. *IEEE CSGRC*, p.197-201.