

Otimização de combinações de óleos essenciais para aplicação na indústria alimentar: efeitos nas propriedades antioxidantes e antimicrobianas

Versão final após defesa

Maria Esperança Anastácio

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica
(2^o ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutor Ângelo Filipe Santos Luís
Coorientadora: Prof.^a Doutora Fernanda da Conceição Domingues

Agosto de 2023

Declaração de Integridade

Eu, Maria Esperança Anastácio, que abaixo assino, estudante com o número de inscrição M11647 de Bioquímica da Faculdade de Ciências, declaro ter desenvolvido o presente trabalho e elaborado o presente texto em total consonância com o **Código de Integridades da Universidade da Beira Interior**.

Mais concretamente afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de Fraude Académica, e que aqui declaro conhecer, que em particular atendi à exigida referenciação de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, e assumindo assim na íntegra as responsabilidades da autoria.

Universidade da Beira Interior, Covilhã 03/08/2023

Dedicatória

Dedico esta dissertação ao meu avô Botas, que sempre foi a minha maior inspiração acadêmica.

Agradecimentos

A elaboração desta dissertação foi o projeto mais desafiante que alguma vez desenvolvi e estou muito grata a todas as pessoas que me apoiaram e propiciaram as condições e ferramentas para a poder realizar da melhor maneira possível.

Primeiramente, quero agradecer ao meu orientador, Professor Doutor Ângelo Filipe Santos Luís, e à minha coorientadora, Professora Doutora Fernanda da Conceição Domingues, pela oportunidade de desenvolver este projeto, por toda a paciência e acompanhamento durante o seu decorrer e pelos ensinamentos que me transmitiram.

À professora Doutora Luísa Maria Jota Pereira Amaral, por toda a disponibilidade e ajuda fornecida no tratamento estatístico dos resultados.

À minha família, principalmente aos meus pais, Luísa e Francisco, e ao meu irmão, Marcos, por serem os meus maiores apoiantes, o meu porto de abrigo e por terem sempre uma palavra amiga.

Aos meus amigos Afonso, Balacó, Beatriz, Beirão, Daniel e Veiga, por terem feito da Covilhã a minha segunda casa nestes últimos cinco anos. Por todo o companheirismo, vivências, conselhos partilhados e por terem feito de mim alguém melhor.

Por fim, quero agradecer a todos os colegas, técnicos e professores que se disponibilizaram para me ajudar ao longo deste ano letivo.

Resumo

A deterioração dos alimentos contribui para o elevado desperdício alimentar globalmente, pois altera o valor nutricional e as propriedades organolépticas dos alimentos. A ocorrência de oxidação e contaminação microbiana são dois dos fatores que contribuem para que a deterioração alimentar ocorra. A presença de microrganismos gera várias alterações nos alimentos, sendo exemplos a produção de ácido láctico, produção de odores desagradáveis e alteração da pigmentação, enquanto a oxidação leva à deterioração da cor, odor, sabor e textura. Assim, de modo a impedir a ocorrência de deterioração alimentar, existem vários métodos de conservação disponíveis (exemplos: refrigeração, fumagem e conservantes químicos). Os conservantes químicos podem ser naturais (exemplos: vinagre e extrato de alecrim) ou artificiais (exemplo: nitrato de sódio), no entanto já foi demonstrado que alguns conservantes artificiais têm efeitos prejudiciais à saúde. Devido à atual demanda dos consumidores por alimentos saudáveis, com maiores tempos de prateleira e livres de conservantes artificiais, estão a ser desenvolvidos vários estudos em busca de novos conservantes naturais e os óleos essenciais são possíveis alternativas. Estes são líquidos lipofílicos extraídos de várias partes de plantas (exemplos: sementes e frutas), conhecidos por apresentarem bioatividade. Assim, o objetivo desta dissertação foi avaliar as interações entre os óleos essenciais de *Cymbopogon martinii* (palmarosa), *Citrus aurantium* ssp. *bergamia* (bergamota), *Cistus ladanifer* (esteva) e *Foeniculum vulgare* (funcho) ao nível das atividades antioxidantes e antimicrobianas. Para fazer estas avaliações, foram realizados o ensaio do sequestro do radical livre DPPH, o ensaio da descoloração do β -caroteno, o ensaio da difusão em disco e o ensaio da microdiluição utilizando a resazurina como indicador de crescimento e usaram-se as seguintes estirpes bacterianas: *Listeria monocytogenes* LMG 16779, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Relativamente à atividade antioxidante, o óleo essencial de esteva apresentou o maior IAA ($5,51 \pm 0,27$) e os menores valores de CI_{50} (%), tanto no ensaio do sequestro do radical livre DPPH ($0,88 \pm 0,28$ v/v), como no ensaio da descoloração do β -caroteno ($0,44 \pm 0,06$ v/v). As combinações de óleos essenciais levaram à inibição do radical livre DPPH e à inibição da peroxidação lipídica, no entanto as interações obtidas foram todas de antagonismo. Relativamente à atividade antimicrobiana, todos os óleos essenciais geraram halos de inibição nas bactérias, com exceção do óleo essencial de funcho, que não demonstrou atividade na bactéria *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ($6,07 \pm 0,13$ mm). Adicionalmente, observou-se

que o óleo essencial de palmarosa apresentou os menores valores de CMI, para todas as bactérias. As combinações de óleos essenciais geraram halos de inibição em todas as bactérias, no entanto as interações observadas foram maioritariamente de antagonismo, destacando-se interações de sinergismo nas combinações de bergamota + esteva, palmarosa + bergamota + esteva e bergamota + esteva + funcho, contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. No ensaio da microdiluição utilizando a resazurina como indicador de crescimento a maioria das interações foram de indiferença e destacou-se uma interação de sinergismo na combinação de palmarosa + bergamota + esteva, contra *Listeria monocytogenes* LMG 16779. As interações de sinergismo sugerem que a combinação dos óleos essenciais de bergamota e esteva potencia a ação dos óleos essenciais de palmarosa e de funcho na bactéria *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e a ação do óleo essencial de palmarosa na bactéria *Listeria monocytogenes* LMG 16779.

Palavras-chave

Atividade antimicrobiana; Atividade antioxidante; Óleos essenciais; Sinergismo.

Abstract

Food deterioration contributes to the global food waste because it changes the organoleptic properties and nutritional value of food products. Oxidation and microbial contamination are two factors responsible for food deterioration. Microorganisms generate several changes in food products, including lactic acid production, unpleasant odor production and changes in the pigmentation, while oxidation generates deterioration of color, odor, flavor and texture. Thus, to avoid food deterioration, many preservation techniques are available (examples: refrigeration, smoking and chemical preservatives). There are several natural (examples: vinegar and rosemary extract) and artificial (examples: sodium nitrate) chemical preservatives, however it has been demonstrated that some artificial preservatives cause adverse health effects. Due to consumer demand for healthy foods, with extended shelf life and free from artificial chemical preservatives, research is being conducted with the aim of finding new natural preservatives and essential oils are possible alternatives. Essential oils are lipophilic liquids, extracted from several plant parts (examples: seeds and fruits), known for their bioactivity. Hence, the aim of this dissertation was to assess the effect of the interactions between the essential oils *Cymbopogon martinii* (palmarosa), *Citrus aurantium* ssp. *bergamia* (bergamot), *Cistus ladanifer* (rockrose) and *Foeniculum vulgare* (fennel) on the antioxidant and antimicrobial activities. In order to assess these activities, the DPPH radical scavenging assay, the β -carotene bleaching assay, the disc diffusion assay and the resazurin microtiter assay were carried out and the following bacterial strains were used: *Listeria monocytogenes* LMG 16779, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Regarding the antioxidant activity, the rockrose essential oil presented the best IAA ($5,51 \pm 0,27$) and the lowest CI_{50} (%) values on the DPPH radical scavenging assay ($0,88 \pm 0,28$ v/v) and on the β -carotene bleaching assay ($0,44 \pm 0,06$ v/v). The essential oil combinations inhibited the DPPH radical and the lipid peroxidation, however the obtained interactions were all antagonistic. Regarding the antimicrobial activity, all of the essential oils generated inhibition zones on the bacterial strains, with the exception of fennel essential oil, which demonstrated no activity on *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ($6,07 \pm 0,13$ mm). Additionally, it was observed that the palmarosa essential oil presented the lowest CMI values for all the bacterial strains. The essential oil combinations generated inhibition zones on all of the bacterial strains, however the interactions were predominantly antagonistic. Synergistic interactions were observed for the combinations

of bergamot + rockrose, palmarosa + bergamot + rockrose and bergamot + rockrose + fennel, against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. In the resazurin microtiter assay, the interactions were predominantly of indifference, nevertheless the combination of palmarosa + bergamot + rockrose presented a synergistic interaction against *Listeria monocytogenes* LMG 16779. The synergistic interactions suggest that the combination of the essential oils bergamot and rockrose might potentiate the action of the palmarosa and fennel essential oils in the *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 bacteria and the action of palmarosa essential oil in the *Listeria monocytogenes* LMG 16779 bacteria.

Keywords

Antimicrobial activity; Antioxidant activity; Essential oils; Synergism.

Índice

Capítulo 1- Introdução	1
1.1 Conservação alimentar	1
1.1.1 Métodos tradicionais	1
1.1.1.1 Secagem	1
1.1.1.2 Adição de sal e açúcar.....	2
1.1.1.3 Refrigeração e congelamento	2
1.1.1.4 Pasteurização	3
1.1.1.5 Conservação em latas e frascos	3
1.1.1.6 Fermentação	3
1.1.1.7 Cura	4
1.1.1.8 Fumagem	4
1.1.1.9 Conservantes químicos	4
1.1.2 Métodos Modernos	5
1.2 Microrganismos e deterioração alimentar	5
1.2.1 Leveduras, bolores e bactérias	6
1.2.1.1 Leveduras	6
1.2.1.2 Bolores	6
1.2.1.3 Bactérias	7
1.2.3 Agentes antimicrobianos	9
1.2.3.1 Naturais	9
1.2.3.2 Sintéticos	10
1.3 Oxidação alimentar	11
1.4 Antioxidantes	12
1.4.1 Exógenos	12
1.4.2 Sintéticos.....	13
1.5 Óleos essenciais.....	14
1.5.1 Métodos de extração.....	14
1.5.2 Características físicas e composição química	15

1.5.3 Bioatividade	16
1.5.4 Interações entre óleos essenciais	17
1.5.5 Farmacocinética e toxicidade	19
1.5.6 Aplicação na indústria alimentar	20
1.5.7 Palmarosa	22
1.5.8 Bergamota	22
1.5.9 Esteva	23
1.5.10 Funcho	24
1.6 Avaliação da atividade antioxidante	25
1.6.1 Ensaio do sequestro do radical livre DPPH	25
1.6.2 Ensaio da descoloração do β -caroteno	26
1.7 Avaliação da atividade antimicrobiana	27
1.7.1 Ensaio da difusão em disco	27
1.7.2 Ensaio da microdiluição utilizando a resazurina como indicador de crescimento	27
Capítulo 2- Objetivo	29
Capítulo 3- Materiais e métodos	30
3.1. Óleos essenciais	30
3.2. Determinação da composição química dos óleos essenciais	30
3.3. Avaliação da atividade antioxidante	31
3.3.1 Ensaio do sequestro de radical livre DPPH	31
3.3.1.1 Óleos essenciais	31
3.3.1.2 Combinações de óleos essenciais	32
3.3.2 Ensaio da descoloração do β -caroteno	34
3.3.2.1 Óleos essenciais	34
3.3.2.2 Combinações de óleos essenciais	35
3.4 Avaliação da atividade antimicrobiana	38
3.4.1 Preparação dos meios de cultura e das culturas bacterianas	38
3.4.2 Ensaio da difusão em disco	39
3.4.3 Ensaio da microdiluição utilizando a resazurina como indicador de crescimento	40
Capítulo 4- Resultados	42
4.1 Determinação da composição química dos óleos essenciais	42
4.2 Avaliação da atividade antioxidante	50

4.3 Avaliação da atividade antimicrobiana.....	53
Capítulo 5- Discussão de Resultados	66
5.1 Composição química dos óleos essenciais.....	66
5.2 Atividade antioxidante.....	68
5.3 Atividade antimicrobiana	72
Capítulo 6- Conclusão e Perspetivas Futuras	80
Capítulo 7- Referências bibliográficas	81

Lista de Figuras

Figura 1- Palmarosa	22
Figura 2- Bergamota	23
Figura 3- Esteva	24
Figura 4- Funcho	24
Figura 5- Reação de redução do radical livre DPPH a DPPH-H, por um antioxidante (AH) que se oxida (\bullet A)	26
Figura 6- Reação de oxidação do carotenoide β -caroteno, por um radical peroxilo ($\text{ROO}\bullet$)	26
Figura 7- Avaliação da suscetibilidade da bactéria <i>Listeria monocytogenes</i> LMG 16779 ao OE de palmarosa pelo ensaio da difusão em disco	27
Figura 8- Reação de redução da resazurina a resorufina	28
Figura 9- Cromatograma correspondente à análise química do OE de palmarosa	42
Figura 10- Cromatograma correspondente à análise química do OE de bergamota.....	44
Figura 11- Cromatograma correspondente à análise química do OE de esteva	46
Figura 12- Cromatograma correspondente à análise química do OE de funcho	49
Figura 13- Fotografias tiradas ao microscópio ótico às placas de Petri da bactéria <i>Listeria monocytogenes</i> LMG 16779 (ampliação 100 \times)	61
Figura 14- Fotografias tiradas ao microscópio ótico às placas de Petri da bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 (ampliação 100 \times)	61
Figura 15- Fotografias tiradas ao microscópio ótico às placas de Petri da bactéria <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 (ampliação 100 \times)	62
Figura 16- Fotografias tiradas ao microscópio ótico às placas de Petri da bactéria <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 (ampliação 100 \times)	63
Figura 17- Fotografias tiradas ao microscópio ótico às placas de Petri da bactéria <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 (ampliação 100 \times)	63
Figura 18- Fotografias tiradas ao microscópio ótico às placas de Petri da bactéria <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 13311 (ampliação 100 \times)	64

Lista de Tabelas

Tabela 1- Compostos identificados no OE de palmarosa, tempo de retenção (minutos), percentagem (%) relativa e família química	42
Tabela 2- Compostos identificados no OE de bergamota, tempo de retenção (minutos), percentagem (%) relativa e família química	44
Tabela 3- Compostos identificados no OE de esteva, tempo de retenção (minutos), percentagem (%) relativa e família química	46
Tabela 4- Compostos identificados no OE de funcho, tempo de retenção (minutos), percentagem (%) relativa e família química	49
Tabela 5- Efeito dos OE na percentagem de inibição (%) do radical livre DPPH e da descoloração do β -caroteno	50
Tabela 6- Propriedades antioxidantes dos OE, avaliadas pelo ensaio do sequestro do radical livre DPPH	51
Tabela 7- Propriedades antioxidantes dos OE, avaliadas pelo ensaio da descoloração do β -caroteno	51
Tabela 8- Efeito das combinações binárias, ternárias e quaternária de OE na percentagem (%) de inibição do radical livre DPPH e da descoloração do β -caroteno	51
Tabela 9- Interações entre as combinações binárias de OE, avaliadas pelo ensaio do sequestro do radical livre DPPH e pelo ensaio da descoloração do β -caroteno	52
Tabela 10- Interações entre as combinações ternárias e quaternária de OE, avaliadas pelo ensaio do sequestro do radical livre DPPH e pelo ensaio da descoloração do β -caroteno	53
Tabela 11- Resultados dos ensaios da difusão em disco, da microdiluição utilizando a resazurina como indicador de crescimento e das interações entre OE para cada ensaio, com a respetiva classificação, para a bactéria <i>Listeria monocytogenes</i> LMG 16779	54
Tabela 12- Resultados dos ensaios da difusão em disco, da microdiluição utilizando a resazurina como indicador de crescimento e das interações entre OE para cada ensaio, com a respetiva classificação, para a bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	55
Tabela 13- Resultados dos ensaios da difusão em disco, da microdiluição utilizando a resazurina como indicador de crescimento e das interações entre OE para cada ensaio, com a respetiva classificação, para a bactéria <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	56

Tabela 14- Resultados dos ensaios da difusão em disco, da microdiluição utilizando a resazurina como indicador de crescimento e das interações entre OE para cada ensaio, com a respetiva classificação, para a bactéria *Escherichia coli* ATCC 2592257

Tabela 15- Resultados dos ensaios da difusão em disco, da microdiluição utilizando a resazurina como indicador de crescimento e das interações entre OE para cada ensaio, com a respetiva classificação, para a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2785358

Tabela 16- Resultados dos ensaios da difusão em disco, da microdiluição utilizando a resazurina como indicador de crescimento e das interações entre OE para cada ensaio, com a respetiva classificação, para a bactéria *Salmonella* Typhimurium ATCC 1331159

Lista de Acrónimos

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AGP	Ácidos Gordos Polinsaturados
BAL	Bactérias ácido lácticas
BHA	Butylated Hydroxyanisole- hidroxianisol butilado
BHI	Brain Heart Infusion- infusão de cérebro e coração
BHT	Butylated Hydroxytoluene- hidroxitolueno butilado
CG	Cromatografia Gasosa
CIF	Concentração Inibitória Fracionária
CI ₅₀	Concentração que gera 50% de inibição
CMI	Concentração Mínima Inibitória
CSE	Capacidade de Sequestro Experimental
CST	Capacidade de Sequestro Teórica
DIC	Detetor de Ionização à Chama
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2- difenil-1-picrilhidrazilo
EM	Espetrometria de Massa
ERO	Espécies Reativas de Oxigénio
ES	Efeito Sinérgico
FRC	Filmes e Revestimentos Comestíveis
GP	Galato de Propilo
HTST	High Temperature Short Time- temperatura alta curta duração
IAA	Índice de Atividade Antioxidante
LTLT	Low Temperature Long Time- temperatura baixa longa duração
MHA	Müeller-Hinton Agar
MHB	Müeller-Hinton Broth- caldo Müeller-Hinton
NADP	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate- nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
OE	Óleos Essenciais
TAH	Transferência de um Átomo de Hidrogénio
TBHQ	tert-butilhidroquinona
TUE	Transferência de um Único Eletrão
UHT	Ultra High Temperature- temperatura ultra alta
UV	Ultravioleta

Capítulo 1- Introdução

1.1. Conservação alimentar

Anualmente, estima-se que um terço dos alimentos produzidos são desperdiçados a nível global, o que corresponde aproximadamente a 1,3 mil milhões de toneladas¹. A deterioração alimentar contribui para este desperdício, pois altera o valor nutricional e as propriedades organoléticas dos alimentos, e pode ocorrer devido a fatores físicos (temperatura, teor em humidade, temperatura de transição vítrea e cristalização), químicos (putrefação, oxidação, proteólise, hidrólise de pectina, reação de Maillard e rancidez hidrolítica) ou microbianos (bolores, leveduras e bactérias). Existem várias técnicas de conservação que podem ser aplicadas, de modo a prevenir a deterioração alimentar e aumentar o tempo de prateleira dos alimentos. Dependendo das técnicas aplicadas, em relação ao tempo de prateleira, os alimentos podem classificar-se como perecíveis (exemplos: leite, carne e ovos), semi-perecíveis (exemplos: queijos, vegetais e frutas) ou não perecíveis (exemplos: farinha, fruta enlatada e frutos secos), tendo tempos de prateleira de, respetivamente, até 3 semanas, até 6 meses e até vários anos².

1.1.1 Métodos tradicionais

Os métodos tradicionais de conservação são a secagem, a adição de sal ou açúcar, a refrigeração, o congelamento, a pasteurização, a conservação em latas/frascos, a fermentação, a cura, a fumagem e o uso de conservantes químicos.

1.1.1.1 Secagem

A secagem, ou desidratação, é o método de conservação mais antigo e barato e apesar da secagem ao sol ser o método tradicional, este tem vindo a evoluir de modo a garantir uma qualidade superior (exemplos: secagem a vácuo e secagem com micro-ondas). Os microrganismos e as enzimas necessitam de água para ativar os mecanismos de deterioração alimentar, assim a secagem tem como objetivo reduzir a atividade de água (a_w), que representa a razão entre a pressão de vapor num alimento e a pressão de vapor da água e cujo valor indica a proporção de humidade do alimento que está fisicamente disponível para crescimento microbiano. Poucos microrganismos sobrevivem a a_w inferior a 0,88 e a maioria das enzimas estão inativas a a_w inferior a 0,85.

Adicionalmente, a aplicação deste método resulta na redução da massa e do volume dos alimentos e facilita o seu embalamento, transporte e armazenamento, no entanto apresenta como principal desvantagem a perda de propriedades organoléticas e de alguns compostos funcionais (exemplo: vitamina C). Exemplos de alimentos processados por secagem são frutas, vegetais, carne, peixe, chá e café instantâneo²⁻⁵.

1.1.1.2 Adição de sal e açúcar

Tanto a adição de sal como de açúcar, são métodos de conservação baratos que também se baseiam na redução da a_w , uma vez que estes compostos tornam o ambiente hipertónico, o que desencadeia o processo de osmose, no qual a água sai dos microrganismos, levando à desidratação, inativação e morte microbiana. A desvantagem destes métodos é a atual demanda dos consumidores por alimentos com baixo teor em sal e açúcares. A adição de sal é principalmente usada na conservação de carnes e peixes, já a adição de açúcar é principalmente usada para conservar frutas^{3,6,7}.

1.1.1.3 Refrigeração e congelamento

A refrigeração e o congelamento são os métodos de conservação mais usados e baseiam-se na manutenção dos alimentos a baixas temperaturas. O congelamento tem como objetivo inibir a atividade microbiana, já a refrigeração tem o objetivo de desacelerar o crescimento microbiano. Ambos os métodos desaceleram as reações bioquímicas que geram deterioração^{3,4}.

O congelamento é um processo de cristalização e consiste na manutenção dos alimentos a temperaturas abaixo de 0°C, de modo a haver formação de cristais de gelo (nucleação) a partir da água presente nos alimentos e posterior crescimento dos cristais. A nucleação contribui para a redução da a_w , uma vez que reduz a quantidade de água líquida no alimento. O tamanho e número de cristais de gelo influenciará a qualidade final do alimento^{2,3}.

A refrigeração consiste na manutenção dos alimentos a temperaturas entre -1°C e 8°C, no entanto este só é um bom método de conservação a curto prazo, pois vários microrganismos conseguem proliferar após longos períodos de refrigeração^{2,3}.

As desvantagens da refrigeração e do congelamento são a alteração da textura dos alimentos e alterações químicas (exemplo: alimentos congelados podem desenvolver sabor a ranço, após exposição ao ar)³. Exemplos de alimentos conservados por congelamento e refrigeração são frutas e vegetais⁴.

1.1.1.4 Pasteurização

A pasteurização é um método de tratamento térmico cujo nome se deve ao cientista que o desenvolveu, Louis Pasteur, no qual os alimentos são aquecidos a uma temperatura específica, de modo a inativar enzimas e inibir o crescimento de microrganismos causadores de deterioração alimentar^{2,6}.

A eficiência da pasteurização depende da combinação temperatura-duração aplicada e esta é determinada pelo pH do alimento e pelo microrganismo que se quer destruir^{3,6}. Assim, este método pode classificar-se como temperatura baixa-longa duração (LTLT) (65°C durante 30 minutos), temperatura alta-curta duração (HTST) (72°C durante 15-30 segundos) ou temperatura ultra alta (UHT) (135-150°C durante alguns segundos)^{2,4,8}. Após a pasteurização, os alimentos são embalados assepticamente em contentores estéreis e armazenados em condições de refrigeração^{2,4}.

A desvantagem deste método é que causa pequenas alterações nas propriedades organoléticas e no valor nutricional dos alimentos, nomeadamente redução das vitaminas B1, B12 e C e de cálcio e fósforo solúveis^{2,3}. Exemplos de alimentos processados por pasteurização são sumos de fruta, cerveja e leite².

1.1.1.5 Conservação em latas/ frascos

A conservação dos alimentos por este método começa com a sua colocação em latas ou frascos estéreis, que são selados a vácuo e aquecidos, normalmente a 121°C durante 15 minutos. Este tratamento térmico tem como alvo a bactéria *Clostridium botulinum*, que causa botulismo e produz esporos resistentes a temperaturas elevadas, contribuindo também para a inativação de enzimas e outros microrganismos. Exemplos de alimentos conservados por este método são frutas, vegetais, compotas e carnes^{3,4,9}.

1.1.1.6 Fermentação

A fermentação é um método de conservação antigo que utiliza microrganismos (bactérias e leveduras) e enzimas para converter os hidratos de carbono dos alimentos em ácidos orgânicos, dióxido de carbono e etanol, os quais previnem o crescimento microbiano^{3,4,6}. Existem três tipos de fermentação: a alcoólica, a acética e a láctica, que se divide em homoláctica e heteroláctica. Na fermentação alcoólica, a hexose é convertida, por leveduras, a etanol e dióxido de carbono. Na fermentação acética, o género de bactérias *Acetobacter* converte etanol a ácido acético e água. Na fermentação láctica a glucose pode ser convertida a ácido láctico, por homofermentadores, ou a ácido láctico, etanol e dióxido

de carbono, por heterofermentadores. A fermentação torna os alimentos mais saudáveis e aumenta o seu valor nutricional e a sua digestibilidade. Este método é usado, por exemplo, na produção de vinho, pão e iogurtes^{2,3}.

1.1.1.7 Cura

A cura baseia-se na adição de cloreto de sódio, sais de cura (nitritos e nitratos), açúcar e especiarias aos alimentos, de modo a desencadear o processo de osmose, levando à desidratação e à morte microbiana. Para além disso, a adição de sal reduz as reações de oxidação, responsáveis pelo sabor a ranço nos alimentos. Este método altera as propriedades organoléticas dos alimentos e a sua principal desvantagem é que, quando expostos a calor excessivo, os sais de cura decompõem-se, formando nitrosaminas que são compostos carcinogénicos. Exemplos de alimentos conservados por este método são carnes, peixes e vegetais^{3,10}.

1.1.1.8 Fumagem

A fumagem foi um dos primeiros métodos de conservação alimentar e baseia-se na confeção dos alimentos com o fumo produzido pela queima de madeira^{3,6}. A combinação temperatura-duração aplicada varia de acordo com o alimento a conservar, podendo variar entre 41,1 - 71,1°C e durar de poucas horas a vários dias³. O fumo seca os alimentos, criando uma barreira físico-química contra a contaminação microbiana, e produz compostos voláteis que inibem o crescimento microbiano e previnem o sabor a ranço. Uma vez que o fumo apenas tem ação na superfície dos alimentos, este método deve preceder-se do processo de cura¹⁰. Após a fumagem, os alimentos são rapidamente refrigerados e preparados para o comércio³. As principais desvantagens deste método são as emissões atmosféricas de fumo, a perda de nutrientes e a possibilidade de originar hidrocarbonetos aromáticos policíclicos tóxicos ou carcinogénicos. Exemplos de alimentos conservados por fumagem são carnes, peixes e queijos^{3,4}.

1.1.1.9 Conservantes químicos

Os conservantes químicos podem ser naturais ou artificiais².

Os conservantes naturais (exemplos: vinagre e extrato de alecrim) provêm de plantas, animais e microrganismos e funcionam como agentes antioxidantes antimicrobianos e aromatizantes².

Os conservantes artificiais são produzidos industrialmente e classificam-se como antioxidantes (exemplo: hidroxitolueno butilado (BHT)), antimicrobianos (exemplos: parabenos e nitrato de sódio) e antienzimáticos (exemplos: ácido cítrico e polifosfatos). No entanto, alguns destes conservantes são prejudiciais à saúde. Quando ingeridos, os nitratos (usados para conservar carnes) são convertidos a nitritos, que reagem com a hemoglobina, formando meta-hemoglobina, uma substância que pode provocar perdas de consciência e até mesmo ser fatal. Os nitritos (usados para conservar carnes) e os benzoatos (usados para conservar maionese e xaropes) afetam o desenvolvimento fetal e podem ter vários efeitos adversos em grávidas. Os sulfitos (usados para conservar cerveja, vinho e alimentos desidratados) podem desencadear síndromes asmáticas e enxaquecas em certas pessoas. Adicionalmente, o benzoato de sódio, o nitrato de sódio e o nitrito de sódio são considerados possíveis agentes carcinogénicos².

1.1.2 Métodos modernos

Devido à crescente demanda do consumidor por alimentos mais saudáveis, seguros e com maiores tempos de prateleira, os métodos de conservação têm sido melhorados e modernizados. Os métodos mais modernos incluem uso de campo elétrico pulsado, irradiação com luz ultravioleta (UV), tratamento com ozono, uso de ondas ultrassom, processamento de alta pressão e uso de nanotecnologia e embalagens ativas^{4,8,11}.

1.2 Microrganismos e deterioração alimentar

Os microrganismos estão presentes no solo, na água, em animais e em plantas e podem contaminar os alimentos durante a sua produção, colheita, abate e processamento⁵.

A atividade bioquímica microbiana (digestão de açúcares, hidratos de carbono complexos, proteínas e gorduras presentes nos alimentos) leva à deterioração alimentar, pois altera as propriedades organolépticas dos alimentos tornando-os indesejáveis para consumo^{5,12,13}. Adicionalmente, os microrganismos podem ser patogénicos ou produtores de toxinas¹³. Segundo a Organização Mundial de Saúde, existem 600 milhões de casos e 420000 mortes anuais por surtos de doenças transmitidas por alimentos e estes têm vindo a aumentar devido à alteração do ambiente e práticas de produção alimentar, à alteração das características genéticas de certos microrganismos patogénicos e ao aumento das trocas globais de alimentos^{14,15}.

Os microrganismos podem gerar as seguintes alterações nos alimentos: produção de ácido láctico (levando à diminuição do pH), produção de etanol e dióxido de carbono,

produção de odores desagradáveis (exemplo: devido à produção de putrescina e cadaverina) ou nocivos, alteração da textura (exemplos: mole, viscosa ou pegajosa) e alteração da pigmentação (exemplo: as bactérias ácido lácticas (BAL) criam uma cor esverdeada na carne)⁵.

Os microrganismos responsáveis pela deterioração alimentar são as leveduras, os bolores e as bactérias⁵.

1.2.1 Leveduras, bolores e bactérias

1.2.1.1 Leveduras

As leveduras geralmente são seres unicelulares, normalmente estão adaptadas a viver em meios líquidos, não produzem metabolitos secundários tóxicos e colonizam alimentos com elevado teor de açúcar ou sal (exemplo: xarope de açúcar) e com baixo pH (exemplo: frutas). Estas podem classificar-se como fermentativas, seres anaeróbios facultativos que conseguem crescer em ambientes com a_w inferior a 0,6 e produzem etanol e dióxido de carbono a partir da digestão dos açúcares, ou como oxidativas, seres aeróbios que crescem em alimentos fermentados e metabolizam álcoois e ácidos orgânicos^{5,13}.

As principais leveduras responsáveis pela deterioração alimentar pertencem aos géneros *Saccharomyces* (fermentativas), *Zygosaccharomyces* (fermentativas) e *Candida* (oxidativas)^{5,12,13}. O género *Saccharomyces* pode contaminar mel, maçãs e produtos à base da maçã, bebidas de fruta, bebidas alcoólicas, laticínios, produtos de padaria, carne e produtos de carne, saladas e molhos¹². O género *Zygosaccharomyces* pode contaminar pralinés de chocolate, refrigerantes, fruta desidratada, bebidas de fruta, bebidas alcoólicas, saladas e molhos¹². O género *Candida* pode contaminar maçãs e produtos à base da maçã, bebidas de fruta, laticínios, produtos de padaria, ovos e azeitonas pretas^{12,16}.

1.2.1.2 Bolores

Os bolores são os microrganismos mais comuns que causam deterioração alimentar, são fungos filamentosos aeróbios obrigatórios, produzem esporos e têm metabolismo oxidativo, do qual podem resultar micotoxinas carcinogénicas. Estes crescem em substratos sólidos, em grandes intervalos de temperatura (no entanto, a maioria é sensível a tratamentos térmicos), em intervalos de pH de 3 a 8 e em intervalos de a_w de 0,62-1, sendo que conseguem deteriorar água mineral engarrafada^{5,13}.

Os principais bolores responsáveis pela deterioração alimentar pertencem aos géneros *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium* e *Rhizopus*^{12,13}. O género *Aspergillus* pode contaminar pralinés de chocolate, frutas, vegetais, bebidas alcoólicas, laticínios, cereais, leguminosas, frutos secos, peixe, ovos, molhos, especiarias e ervas. O género *Mucor* pode contaminar frutas, produtos à base de maçã, vegetais, laticínios, cereais, leguminosas, frutos secos e ovos. O género *Penicillium* pode contaminar frutas, produtos à base de maçã, vegetais, bebidas alcoólicas, laticínios, cereais, produtos de padaria, leguminosas, frutos secos, peixe, ovos, molhos, especiarias e ervas. O género *Rhizopus* pode contaminar frutas, vegetais, cereais, leguminosas e frutos secos^{12,16}.

1.2.1.3 Bactérias

As bactérias classificam-se como Gram-positivas, as quais possuem membrana plasmática (constituída por bicamada fosfolipídica) e uma camada espessa de peptidoglicano ligada a moléculas hidrofóbicas (proteínas e ácido teicóico), ou como Gram-negativas, as quais possuem membrana plasmática (constituída por bicamada fosfolipídica), e uma camada fina de peptidoglicano ligada por lipoproteínas a uma membrana externa, constituída por bicamada fosfolipídica e lipopolissacarídeos (formados por lípido A, polissacarídeo e cadeia lateral O)^{7,17,18}.

As principais bactérias responsáveis pela deterioração alimentar são: *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Staphylococcus aureus*, bactérias da família *Enterobacteriaceae*, do género *Pseudomonas*, BAL e as bactérias formadoras de esporos dos géneros *Clostridium* e *Bacillus*^{12,13,15,19}.

Listeria monocytogenes é uma bactéria ubíqua Gram-positiva, anaeróbia facultativa pertencente à família *Listeriaceae* que consegue sobreviver em ambientes com a_w inferior a 0,9, num intervalo de pH de 4,6 a 9,5 e com concentração de sal até 20%. Esta é patogénica causando uma doença designada listeriose, que mundialmente tem uma taxa de mortalidade entre 20-30%. Os sintomas desta doença podem ser moderados, incluindo febre, dores musculares, náusea, vómitos e diarreia, ou graves incluindo dores de cabeça, torcicolo, confusão, perda de equilíbrio e convulsões^{20,21}. Esta bactéria pode contaminar frutas, vegetais, laticínios, cereais, leguminosas, frutos secos, carne e produtos de carne, peixe, ovos, especiarias e ervas¹⁶.

Campylobacter jejuni é uma bactéria ubíqua Gram-negativa, microaerófila pertencente à família *Campylobacteraceae* que apresenta um flagelo num lado, ou dois flagelos em lados opostos da célula. Esta é um agente patogénico zoonótico cuja fonte mais comum são as aves de capoeira e em humanos causa uma doença designada campilobacteriose, cujos sintomas incluem dores abdominais, dores de cabeça, vómitos, febre e diarreia que

pode ter presença de sangue. As complicações desta doença a longo prazo são raras e incluem artrite reativa, neuropatias periféricas e síndrome de Miller Fisher²²⁻²⁴. Esta bactéria pode contaminar frutas, vegetais, laticínios, carne, peixe e ovos¹⁶.

Staphylococcus aureus é uma bactéria ubíqua Gram-positiva, anaeróbia facultativa pertencente à família *Staphylococcaceae*, que coloniza 20-30% dos humanos persistentemente no nariz e frequentemente na pele, garganta, axilas, virilhas e intestino^{25,26}. Esta é patogénica e está associada a várias infeções de pele, pneumonia e outras infeções do trato respiratório, infeções em feridas cirúrgicas, infeções em próteses articulares, infeções cardiovasculares e bacteremia nosocomial²⁷. Esta bactéria pode contaminar laticínios, cereais, carne e produtos de carne, peixe, ovos, especiarias, ervas, bebidas e alimentos enlatados/enfrascados¹⁶.

As bactérias da família *Enterobacteriaceae* (exemplos: bactérias dos géneros *Escherichia* e *Salmonella*) podem contaminar laticínios, carne e peixe¹². As bactérias do género *Salmonella* e a bactéria *Escherichia coli* podem ainda contaminar frutas, vegetais, cereais, leguminosas, frutos secos, produtos de carne, ovos, especiarias, ervas, molhos e bebidas¹⁶. *Escherichia coli* é uma bactéria ubíqua Gram-negativa, anaeróbia facultativa. Esta bactéria é comensal e coloniza o trato intestinal de humanos e animais de sangue quente^{28,29}. No entanto, também existem estirpes patogénicas de *Escherichia coli* e estas podem causar meningite neonatal, patologias intestinais, bacteremia e infeções do trato urinário, intra-abdominais, pulmonares, de pele e de tecidos moles³⁰. *Salmonella* Typhimurium é uma bactéria ubíqua Gram-negativa, anaeróbia facultativa. Esta é patogénica, sendo responsável por aproximadamente 155000 mortes anualmente e causa gastroenterite, associada a sintomas como diarreia, cólicas, vómitos, dores de cabeça e febre³¹⁻³³.

As bactérias do género *Pseudomonas* podem contaminar frutas, vegetais, vegetais fermentados, laticínios, bebidas de fruta, carne, peixe e ovos^{12,16}. *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria ubíqua Gram-negativa aeróbia, pertencente à família *Pseudomonadaceae* que apresenta um flagelo que lhe confere mobilidade e produz piocianina, um pigmento azul. Esta consegue adaptar-se a diferentes ambientes, está associada a infeções nosocomiais e é a principal causa de pneumonias associadas a ventiladores, infeções do trato urinário, infeções sanguíneas e infeções crónicas³⁴⁻³⁶.

As BAL podem contaminar vegetais fermentados, bebidas alcoólicas, laticínios, bebidas de fruta, carne e produtos de carne, peixe, marisco, especiarias, ervas e molhos^{12,16}. *Enterococcus faecalis* é uma bactéria ubíqua Gram-positiva, anaeróbia facultativa pertencente à família *Enterococcaceae*. Esta é uma BAL comensal e coloniza o trato gastrointestinal de mamíferos, no entanto também pode ser patogénica, estando

associada a infecções nosocomiais, infecções do trato urinário, bacteremia, endocardite e peritonite³⁷⁻³⁹.

As bactérias formadoras de esporos dos géneros *Bacillus* e *Clostridium* podem contaminar frutas, vegetais, laticínios, cereais, leguminosas, frutos secos, especiarias, ervas, molhos, bebidas de fruta e alimentos enlatados/enfrascados. As bactérias do género *Bacillus* podem ainda contaminar pralinés de chocolate, produtos de padaria e ovos e as bactérias do género *Clostridium* podem ainda contaminar carne^{12,16}.

1.2.3 Agentes antimicrobianos

1.2.3.1 Naturais

Os agentes antimicrobianos naturais podem ter origem em microrganismos, animais ou plantas^{15,40}.

Os principais compostos derivados de microrganismos são as bacteriocinas (exemplos: nisina e pediocina), que são proteínas sintetizadas no ribossoma bacteriano. Estas são principalmente produzidas pelas BAL, estão ativas num grande intervalo de pH, são efetivas em baixas concentrações e toleram elevado stresse térmico. A sua ação antimicrobiana deve-se à formação de poros na membrana plasmática, que leva à dissipação do potencial transmembranar com conseqüente efluxo dos componentes celulares e morte celular^{40,41}.

Relativamente aos compostos derivados de animais, os principais são o quitosano, a lisozima, a lactoferrina, a lactoperoxidase e os péptidos antimicrobianos (exemplo: lactoferrina)^{15,40}. O quitosano é um polissacarídeo derivado da quitina que se encontra tipicamente em exoesqueletos de crustáceos e artrópodes. A sua ação antimicrobiana envolve a interação dos grupos amina positivamente carregados com os componentes da membrana plasmática ou com os polissacarídeos aniónicos da parede celular, levando à alteração da permeabilidade, ao efluxo de componentes celulares e à morte celular. Adicionalmente, o quitosano age como quelante de nutrientes e de metais pesados e pode formar uma membrana de polímero na superfície microbiana, que age como barreira de nutrientes e de oxigénio^{40,42,43}. A lisozima é uma enzima encontrada em leite de mamíferos, ovos de aves e em peixe. A ação antimicrobiana da lisozima deve-se à sua capacidade de hidrolisar a ligação β -1,4 entre o ácido N-acetilmurâmico e a N-acetilglucosamina, presentes no peptidoglicano da parede microbiana, levando à lise celular⁴⁰⁻⁴². A lactoferrina é uma glicoproteína presente no leite que liga dois iões férricos por cada molécula de proteína. A sua ação antimicrobiana está associada à privação microbiana de ferro e à destabilização da membrana externa das bactérias Gram-

negativas, que leva à difusão de lipopolissacarídeos e aumento da permeabilidade da membrana^{40,42,44}. A lactoperoxidase é uma enzima presente no leite e secreções como saliva e lágrimas. Esta glicoproteína catalisa a oxidação do tiocianato (SCN^-) na presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), formando as substâncias antimicrobianas hipotiocianito (OSCN^-) e ácido hipotiocianoso (HOSCN), que oxidam os grupos sulfidrilo das enzimas e proteínas, resultando na inibição do crescimento microbiano e na morte celular^{40,42}.

A maioria dos péptidos antimicrobianos estudados são catiónicos e anfífilos e estes conseguem ligar-se às membranas celulares, negativamente carregadas, alterando o potencial eletroquímico, o que leva ao efluxo de componentes celulares, destruição da morfologia e morte celular⁴³.

Relativamente aos compostos derivados de plantas, estes podem estar presentes em frutas, vegetais, sementes, folhas, ervas, especiarias, leguminosas, extratos e óleos essenciais (OE). Os compostos com maior atividade antimicrobiana são os polifenóis, os péptidos antimicrobianos e os compostos presentes em OE (terpenos, terpenoides e fenilpropanoides)^{15,40}. A atividade antimicrobiana dos polifenóis está associada à destabilização e permeação da membrana plasmática levando a danos nos componentes celulares, interferência no metabolismo microbiano e privação de micronutrientes minerais essenciais⁴⁰. A atividade antimicrobiana dos OE deve-se à alteração da permeabilidade celular, danos na membrana plasmática, interferência com o sistema de geração de energia celular e disrupção da força motriz⁴⁰.

1.2.3.2 Sintéticos

Os principais agentes antimicrobianos sintéticos usados na indústria alimentar são os ácidos orgânicos (exemplos: ácido acético, ácido láctico, ácido benzóico e ácido sórbico) e respetivos sais (exemplos: acetatos, lactatos, benzoatos e sorbatos), os ácidos inorgânicos (nitratos, nitritos, dióxido de enxofre e sulfitos) e os álcoois^{42,44}.

A ação antimicrobiana dos ácidos orgânicos depende da diminuição do pH. Em baixo pH, os ácidos orgânicos fracos permanecem no estado não dissociado, ou seja, não apresentam carga e a sua lipofilia permite-lhes atravessar a membrana plasmática dos microrganismos. Dentro dos microrganismos o pH é superior, o que leva à dissociação dos ácidos, gerando desordens metabólicas que levam à morte celular^{41,44}.

A atividade antimicrobiana dos nitratos e nitritos deve-se à formação de ácido nitroso e de óxidos de nitrogênio. Além disso, os nitritos limitam a fosforilação oxidativa e consumo de oxigênio, afetando a conservação de energia, inibem enzimas metabólicas e causam o colapso do gradiente de prótons ao longo da membrana celular^{41,42}. Os sulfitos,

quando em baixo pH convertem-se em ácido sulfuroso, um forte agente antimicrobiano⁴⁵. Relativamente ao dióxido de enxofre, a ação antimicrobiana deve-se à sua difusão para a membrana celular, a qual leva à disrupção do metabolismo celular⁴². Os álcoois causam danos na membrana celular, desnaturação de proteínas no citoplasma bacteriano e lise celular⁴¹.

1.3. Oxidação alimentar

Os alimentos podem sofrer oxidação, sendo que os produtos de oxidação se acumulam e permanecem nos alimentos até estes serem consumidos, levando à deterioração da cor, odor, sabor e textura⁴⁶.

Os lípidos estão presentes principalmente em óleos vegetais (exemplos: azeite e óleo de coco), peixe, carne e derivados (exemplos: ovos, leite, manteiga e óleo de peixe)⁴⁷. Estes alimentos, principalmente os ricos em ácidos gordos polinsaturados (AGP) e colesterol, são vulneráveis à peroxidação lipídica, a qual depende não só de fatores intrínsecos (composição alimentar), mas também de fatores extrínsecos (condições de processamento e armazenamento)^{46,48}.

A peroxidação lipídica deve-se à elevada suscetibilidade dos AGP à ação de radicais livres e das espécies reativas de oxigénio (ERO) (ozono (O_3), oxigénio singleto (1O_2), radical anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$), H_2O_2 e radical hidroxilo ($\cdot OH$)), principalmente quando contém elevado número de ligações duplas^{46,49,50}. Esta pode ocorrer pelos seguintes processos: auto-oxidação, foto-oxidação, oxidação catalisada por metais e oxidação enzimática^{46,48}. A auto-oxidação divide-se em três fases: iniciação, propagação e terminação. Na fase de iniciação há interação das ERO com os AGP, formando-se um radical lipídico ($L\cdot$), que reage com uma molécula de oxigénio (O_2) e converte-se em radical peróxilo lipídico ($LOO\cdot$). Na fase de propagação o radical $LOO\cdot$ interage com lípidos próximos formando hidroperóxidos lipídicos ($LOOH$), os quais na presença de metais de transição se convertem a radicais alcóxilo lipídico ($LO\cdot$). Os radicais $LO\cdot$ podem remover hidrogénios de lípidos próximos formando LOH e $L\cdot$, iniciando um novo ciclo. A fase de terminação acontece quando ocorre ciclização ou degradação dos radicais $LOO\cdot$ e $LO\cdot$, formando vários produtos (alcanos, alcenos e aldeídos) reativos que levam à alteração do valor nutricional e das propriedades organoléticas dos alimentos^{50,51}. A foto-oxidação é mais rápida que a auto-oxidação e ocorre devido à reação entre oxigénio singleto ativado pela luz e ácidos gordos insaturados, levando à formação de hidroperóxidos. A oxidação catalisada por metais acontece quando metais presentes em óleos, ou adicionados durante o processo de refinamento, (exemplos: cobalto e magnésio) reagem com uma molécula de oxigénio produzindo anião superóxido, o qual se converte em oxigénio

singleto ou radical peróxilo, os quais podem formar hidroperóxidos⁴⁷. A oxidação enzimática é catalisada pela enzima lipoxigenase, que exibe atividade quando o ferro do seu sítio ativo está na forma ferrosa e oxida AGP, formando hidroperóxidos^{47,51}. Os produtos da degradação de hidroperóxidos lipídicos podem ser hidrocarbonetos, álcoois, furanos, aldeídos, cetonas ou ácidos, sendo que os aldeídos alifáticos são os principais responsáveis por odores e sabores tipicamente associados à rancidez⁴⁷.

As proteínas estão presentes principalmente em carne, peixe, queijo, leite, ovos, cereais e leguminosas⁴⁷. Estes alimentos são vulneráveis à oxidação proteica, a qual depende dos seguintes fatores: estrutura e composição proteica, enzimas, iões metálicos e condições de processamento e armazenamento⁴⁶.

A oxidação proteica pode ocorrer por dois mecanismos: oxidação direta por espécies reativas de oxigénio, nitrogénio e cloro ou oxidação induzida pelos produtos da peroxidação lipídica (exemplo: malondialdeído) e da oxidação de açúcares (exemplo: dicarbonilos). Dependendo das modificações estruturais causadas, a oxidação pode ser reversível (exemplo: S-nitrosilação) ou irreversível (exemplo: carbonilação), na qual haverá agregação e degradação⁴⁶.

1.4 Antioxidantes

Os antioxidantes são compostos, naturais ou sintéticos, com a capacidade de sequestrar espécies reativas levando à redução/inibição do stresse oxidativo⁵².

1.4.1 Exógenos

Os antioxidantes exógenos podem ter origem animal, sendo exemplos o mel e o quitosano, mas a sua principal fonte é o reino das plantas, onde geralmente são produto de reações de defesa contra agressores ambientais. Os antioxidantes exógenos agem não só como inibidores de processos de oxidação, mas também como nutracêuticos e ingredientes funcionais, destacando-se as vitaminas A, C e E, os carotenoides e os flavonoides naturais^{15,52-54}.

Vitamina A é o termo usado para um grande grupo de compostos relacionados. A forma pronta a ser usada pelo organismo designa-se vitamina A pré-formada e engloba o retinol e o retinal. Os carotenoides são fontes desta vitamina uma vez que podem ser convertidos em retinol e retinal^{47,55}.

A vitamina C possui 4 grupos hidroxilo e consegue sequestrar ERO e inibir a oxidação, no entanto quando em baixos níveis pode agir como um catalisador de oxidação no tecido

muscular. Exemplos de fontes desta vitamina são maçã, banana, brócolos, alho, morango e sumo de laranja⁵⁵.

A vitamina E é constituída por quatro grupos tocoferol e quatro grupos tocotrienol, sendo que a capacidade antioxidante do α -tocoferol tem sido estudada e depende de vários fatores. Exemplos de fontes desta vitamina são chá verde, azeitonas, azeite e sementes de abóbora⁵⁵.

Os carotenoides têm atividade provitamina A e agem como *quenchers* de oxigénio singlete e ainda como sequestradores de ERO. Na dieta humana estão presentes principalmente como α e β -caroteno, licopeno e hidroxi-carotenoides. O β -caroteno, constituído por dois grupos retinil, é clivado na mucosa do intestino delgado originando retinal, uma forma de vitamina A. Exemplos de fontes de carotenoides são hortelã-pimenta, salsa, coentro e sumo de laranja⁵⁵.

Os flavonoides são compostos polifenólicos que possuem dois anéis aromáticos, A e B, ligados por três carbonos que formam um heterociclo oxigenado, anel C. Estes dividem-se em 14 subclasses, dependendo do nível de oxigenação do anel C, as principais são flavonas, flavanonas, flavonóis, flavanóis, isoflavonoides e antocianidinas. Exemplos de fontes de flavonoides são mel, sumo de laranja, vinho, funcho, chá verde e grãos de soja^{47,55}.

1.4.2 Sintéticos

Os antioxidantes sintéticos são muito usados na indústria alimentar pois são estáveis, têm baixo custo e elevada disponibilidade, contrariamente aos antioxidantes naturais, que têm pouca estabilidade e são de extração difícil. Os antioxidantes sintéticos mais usados são antioxidantes fenólicos e os mais importantes são: BHT (E321), hidroxianisol butilado (BHA) (E320), galato de propilo (GP) (E310) e *tert*-butilhidroquinona (TBHQ) (E319)^{53,56}. As doses diárias aceitáveis de BHT, BHA, GP e TBHQ são, respetivamente, 0,25 mg/kg peso corporal/dia, 1 mg/kg peso corporal/dia, 0,5 mg/kg peso corporal/dia e 0,7 mg/kg peso corporal/dia⁵⁶.

Estudos mostraram que quando usados incorretamente, ou em excesso, os antioxidantes fenólicos têm efeitos negativos para a saúde e para o ambiente. O GP não é carcinogénico, mas pode ser tóxico para o fígado e testículos. O BHT leva à promoção tumoral, danos no ADN e stresse oxidativo, este demonstrou cardiotoxicidade em embriões de peixe zebra podendo ser teratogénico para organismos aquáticos. O BHA é citotóxico e carcinogénico. O TBHQ pode causar tumores gástricos e danos no ADN, entre outros. Assim é necessário diminuir o uso de antioxidantes sintéticos e substituí-los por alternativas naturais^{53,56}.

1.5. Óleos essenciais

Os OE, também chamados de óleos voláteis ou etéreos, são líquidos lipofílicos extraídos de várias partes das plantas (exemplos: raíz, madeira, sementes, ervas e frutas)⁵⁷. Normalmente encontram-se em canais oleíferos, canais resiníferos e tricomas e são constituídos por metabolitos secundários, que podem estar sempre presentes ou apenas ser sintetizados durante situações de stresse (exemplo: infecção). Estes metabolitos atraem inimigos naturais de herbívoros, dispersores de sementes e polinizadores e atuam como mensageiros entre plantas, na proteção contra agentes patogénicos e na proteção contra variações extremas de temperatura^{7,18,58}.

Os OE têm particular interesse para as indústrias alimentar, farmacêutica e de cosmética, sendo principalmente usados na produção de aromas alimentares, hidratantes, produtos de cabelo, perfumes, sabão, detergentes, inseticidas, tintas e medicação^{57,59,60}.

1.5.1 Métodos de extração

Os métodos convencionais usados para extrair OE são a hidrodestilação, a destilação por arrastamento de vapor de água, a prensagem a frio e a extração com solventes⁶¹.

A diferença entre os dois métodos de destilação é que na hidrodestilação a parte da planta de onde se quer extrair o OE é imersa em água a ferver, já na destilação por arrastamento de vapor aquece-se a parte da planta com os vapores da água a ferver. Nestes métodos, a temperatura elevada leva à ebulição dos compostos voláteis e o vapor de água pressiona os vapores desses compostos em direção ao condensador, onde são arrefecidos e retornam à fase líquida^{57,62}. Após a condensação obtêm-se os OE e o hidrolato (mistura de água e compostos hidrossolúveis) e estes formam duas fases, que são separadas de acordo com as suas densidades^{61,63}.

A prensagem a frio é quase exclusiva para OE do género *Citrus* (citrinos), uma vez que os aldeídos presentes nas suas cascas têm instabilidade térmica. Este é um método mecânico que extrai o OE através da quebra das glândulas da casca e cutículas, obtendo-se uma emulsão que é separada através de centrifugação⁶¹.

A extração com solventes é útil para compostos termolábeis e baseia-se na imersão da parte da planta num banho de solventes, que a vão dissolver, seguindo-se de filtração e subsequente destilação. Os solventes que podem ser usados são etanol, acetona, hexano, metanol ou éter de petróleo. Uma vez que restam sempre alguns resíduos de solvente nos OE, este método de extração não pode ser usado para aplicações alimentares^{57,61}.

Têm surgido métodos alternativos de extração de OE, como a extração assistida por micro-ondas e a extração com fluido supercrítico, estes têm o intuito de aumentar o rendimento e de reduzir a perda de compostos voláteis, o consumo energético, o tempo de extração, a emissão de dióxido de carbono e o uso de solventes^{57,61}.

1.5.2 Características físicas e composição química

Os OE são solúveis em etanol, éter e óleos fixos, geralmente são transparentes ou amarelos, no entanto também existem noutras cores como verde e azul-marinho. Normalmente a densidade é inferior a 1 g/cm³, havendo poucas exceções (exemplo: canela), relativamente à viscosidade os OE podem ser fluidos, assemelhar-se a mel ou até mesmo a cera e alguns óleos mais viscosos podem formar cristais durante o seu armazenamento^{62,64}.

A composição química varia de acordo com a espécie, parte da planta de onde são extraídos, localização geográfica, condições edafoclimáticas, fertilização (fertilizantes contendo potássio, nitrogénio e fósforo podem aumentar a quantidade de OE e alterar a sua composição), mudanças sazonais, variações no tempo de colheita, secagem, processo de extração (durante o qual podem ocorrer reações de oxidação e de hidrólise) e armazenamento^{17,57,59}.

Num só OE podem ser identificados até 400 compostos, como terpenos, terpenoides, polifenóis, ácidos, álcoois, aldeídos, aminas, cetonas, ésteres, epóxidos e sulfuretos. O grupo principal são os terpenos (exemplo: limoneno), hidrocarbonetos sintetizados a partir de unidades de isopreno (C₅H₈), e as suas classes mais importantes são os monoterpenos, sintetizados a partir de 2 unidades de isopreno (C₁₀H₁₆), e os sesquiterpenos, sintetizados a partir de 3 unidades de isopreno (C₁₅H₂₄). Os monoterpenos ocorrem nas formas linear, monocíclica e bicíclica, já os sesquiterpenos ocorrem nessas formas e na forma tricíclica. Os terpenoides (exemplo: linalol) formam-se devido à modificação de terpenos por enzimas, através da relocação/eliminação do grupo metilo ou da adição de oxigénio, e categorizam-se como álcoois, aldeídos, cetonas, epóxidos, ésteres, éteres ou fenóis. Os polifenóis constituem uma porção muito pequena dos OE e são categorizados como fenilpropanoides (exemplo: anetol), que são constituídos por um grupo fenol e por um grupo propeno, ou como flavonoides (exemplo: quercetina)^{7,18,65}.

As características de cada OE têm a ver com a sua composição química e com as percentagens de cada composto, podendo haver um só composto dominante ou vários. Existem compostos dominantes que são comuns em OE de um mesmo género, como é o exemplo do limoneno em óleos do género *Citrus*⁶⁵. Contrariamente, existem compostos

que são raros, devido ao caráter endêmico da planta, e apenas existem em poucos OE, um exemplo disto é o éster nudaico, presente no OE extraído dos rizomas de *Annesorhiza nuda*⁶².

A composição química dos OE pode alterar-se devido a temperaturas elevadas (durante a destilação), as quais podem promover hidrólise de ésteres a álcoois e ácidos e produção de artefactos a partir de precursores químicos da planta. Um exemplo de artefacto é o geijereno, que está presente no OE *Geijera parviflora* L. e é produzido a partir do precursor pregeijereno^{61,62}.

1.5.3 Bioatividade

Os OE são considerados disruptores endócrinos, agindo como agonistas do recetor alfa de estrogénio e antagonistas do recetor de androgénio, no entanto também exercem efeitos benéficos. Os OE são usados em tratamentos de cancro, dores de parto, perturbações do sono, doenças inflamatórias (alergias, reumatismo e artrite), doença de Alzheimer e doenças cardiovasculares, representam potenciais tratamentos para a desordem de ansiedade generalizada e depressão, aliviam o stresse e têm atividades antimicrobiana, anti-inflamatória, antidiabética, antiulcerogénica e antioxidante^{18,59}.

A atividade antioxidante dos OE depende da sua composição e geralmente é tanto maior quanto mais compostos fenólicos com ligações duplas conjugadas o OE possuir. Para além disso, a atividade antioxidante também está relacionada com a presença de certos álcoois, éteres, cetonas, aldeídos e monoterpenos⁶⁴.

O caráter lipofílico dos compostos dos OE torna-os capazes de penetrar a dupla camada fosfolipídica da membrana celular bacteriana, levando à disrupção de processos críticos como: transporte de nutrientes, síntese de moléculas estruturais, emissão de reguladores de crescimento, geração de energia e rede de comunicação celular. O seu efeito pode ser bactericida ou bacteriostático, no entanto, como é difícil distingui-los, a atividade antibacteriana é medida como a concentração mínima inibitória (CMI) e a concentração mínima bactericida^{57,59}. Teoricamente as bactérias Gram-negativas, que apresentam uma membrana externa contendo proteínas e lipopolissacarídeos, são mais resistentes à ação dos OE do que as bactérias Gram-positivas, que apresentam uma camada grossa de peptidoglicano ligada a moléculas hidrofóbicas. No entanto, as diferenças nem sempre são notáveis e pensa-se que alguns compostos hidrofóbicos conseguem atravessar a membrana externa através de canais de porinas⁷.

Os OE apresentam atividade antifúngica pois conseguem penetrar a parede celular fúngica e as membranas citoplasmáticas, interrompendo a homeostase da mitocôndria.

Pensa-se que o mecanismo envolve a alteração do fluxo de eletrões ou a despolarização das membranas mitocondriais, levando à apoptose e necrose das células fúngicas⁵⁹.

Os OE apresentam atividade antiviral e, apesar do mecanismo ainda não ser totalmente compreendido, pensa-se que interferem com o desenvolvimento do envelope viral, o qual é necessário para várias funções (exemplos: entrada na célula hospedeira humana e síntese de proteínas virais)⁵⁹.

1.5.4 Interações entre óleos essenciais

As interações entre os OE e os seus compostos são classificadas pelo seu efeito, o qual pode ser sinérgico, aditivo, antagonista, de cooperação ou de potenciação. Quando a combinação dos compostos tem efeito aditivo, este corresponde à soma da atividade dos compostos individuais, já quando o efeito é sinérgico a combinação dos compostos potencia a sua atividade, a qual é maior do que a soma das atividades individuais. A principal diferença entre o sinergismo e a potenciação é que o primeiro acontece entre dois compostos ativos, já a potenciação observa-se quando um composto não ativo potencia a atividade de um composto ativo. O antagonismo representa o oposto do sinergismo, ou seja, quando a combinação dos compostos tem atividade inferior à soma das atividades individuais. A cooperação observa-se quando a presença de um composto melhora a permeação de outro composto^{58,66}.

Os OE têm sido vastamente investigados, por serem constituídos por vários compostos bioativos, no entanto, geralmente são necessárias grandes concentrações para obter as atividades biológicas desejadas, o que pode contribuir para a alteração das propriedades organolépticas dos alimentos. Uma maneira de resolver este problema é o desenvolvimento de combinações de OE que apresentem interações de sinergismo. Purkait, S. *et al.* (2020) estudaram os efeitos sinérgicos das combinações binárias dos OE de *Piper nigrum*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Syzygium aromaticum* na atividade antioxidante, através do ensaio do sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), e na atividade antimicrobiana contra *Bacillus cereus* MTCC 1272, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Listeria monocytogenes* MTCC 657, *Salmonella* Typhimurium MTCC 3224, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e *Aspergillus niger* ATCC 16404, através do método de Checkerboard. Ao nível da atividade antioxidante, as combinações dos OE de *Piper nigrum* com *Cinnamomum zeylanicum* e de *Piper nigrum* com *Syzygium aromaticum* originaram interações de adição, enquanto a combinação de *Cinnamomum zeylanicum* com *Syzygium aromaticum* originou interações de sinergismo. Ao nível da atividade antimicrobiana, as combinações de *Piper nigrum* com *Cinnamomum zeylanicum* e de

Piper nigrum com *Syzygium aromaticum* originaram interações de adição em todos os microrganismos, já a combinação de *Cinnamomum zeylanicum* com *Syzygium aromaticum* originou interações de adição nas bactérias *Bacillus cereus* MTCC 1272 e *Escherichia coli* ATCC 8739 e interações de sinergismo nos microrganismos *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Listeria monocytogenes* MTCC 657, *Salmonella Typhimurium* MTCC 3224, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e *Aspergillus niger* ATCC 16404⁶⁷.

Vieira, M. *et al.* (2017) estudaram os efeitos sinérgicos, ao nível da atividade antimicrobiana, das combinações binárias dos OE de *Mentha pulegium* L. com *Thymus mastichina* L., de *Eucalyptus globulus* Labill. ssp. *globulus* com *Thymus mastichina* L., de *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter ssp. *viscosa* com *Calamintha nepeta* (L.) Savi ssp. *nepeta* e de *Mentha pulegium* L. com *Eucalyptus globulus* Labill. ssp. *globulus* contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e da combinação dos OE de *Foeniculum vulgare* L. com *Calamintha nepeta* (L.) Savi ssp. *nepeta* contra *Escherichia coli* ATCC 25922, através do método de Checkerboard. Os resultados revelaram interações de sinergismo nas combinações dos OE de *Eucalyptus globulus* Labill. ssp. *globulus* com *Thymus mastichina* L. e de *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter ssp. *viscosa* com *Calamintha nepeta* (L.) Savi ssp. *nepeta* contra a bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Para as restantes combinações não foi possível observar interações⁶⁸.

Ayari, S. *et al.* (2020) estudaram os efeitos sinérgicos das combinações binárias dos OE de *Ocimum basilicum*, *Cinnamomum cassia*, *Eucalyptus globulus*, *Citrus reticulata*, *Origanum compactum*, *Mentha piperita*, *Melaleuca alternifolia* e *Thymus vulgaris* na atividade antimicrobiana contra *Paenibacillus amylolyticus* ATCC 9995 e *Bacillus cereus* LSPQ 2872, através do método de Checkerboard. Relativamente à bactéria *Paenibacillus amylolyticus* ATCC 9995, os resultados revelaram interações de adição nas combinações dos OE de *Ocimum basilicum* com *Cinnamomum cassia*, *Eucalyptus globulus*, *Citrus reticulata* e *Mentha piperita*, de *Cinnamomum cassia* com *Melaleuca alternifolia*, de *Eucalyptus globulus* com *Citrus reticulata*, *Origanum compactum*, *Mentha piperita* e *Melaleuca alternifolia*, de *Citrus reticulata* com *Thymus vulgaris*, de *Origanum compactum* com *Melaleuca alternifolia* e de *Mentha piperita* com *Thymus vulgaris* e *Melaleuca alternifolia*. Além disso, observaram-se interações de sinergismo nas combinações de OE de *Origanum compactum* com *Thymus vulgaris* e *Mentha piperita* e de *Thymus vulgaris* com *Melaleuca alternifolia*. Para as restantes combinações não foi possível observar interações. Relativamente à bactéria *Bacillus cereus* LSPQ 2872, os resultados revelaram interações de adição nas combinações dos OE de *Ocimum basilicum* com *Eucalyptus globulus*, *Citrus reticulata*, *Origanum compactum* e *Thymus vulgaris*, de *Cinnamomum cassia* com *Origanum compactum*,

Mentha piperita e *Melaleuca alternifolia*, de *Citrus reticulata* com *Eucalyptus globulus*, *Mentha piperita* e *Origanum compactum* e de *Melaleuca alternifolia* com *Origanum compactum*, *Mentha piperita* e *Thymus vulgaris*. Além disso, observaram-se interações de sinergismo nas combinações de OE de *Thymus vulgaris* com *Cinnamomum cassia*, *Origanum compactum* e *Mentha piperita*. Para as restantes combinações não foi possível observar interações⁶⁹.

Os estudos exemplificados demonstram os vários tipos de interações que podem ocorrer entre os OE e, além disso, demonstram que uma mesma combinação de OE pode resultar em várias interações diferentes, dependendo do microrganismo em estudo.

1.5.5 Farmacocinética e toxicidade

Os OE podem ser inalados, ingeridos ou absorvidos topicamente pela pele e membranas mucosas⁵⁸.

A absorção dos OE pela pele é favorecida pela sua lipofilicidade e depende de fatores como idade, hidratação, temperatura, pressão, microbioma e condições de pele específicas. A absorção acontece por duas vias principais, o OE é absorvido no espaço entre as células (via intercelular) ou através das células (via transcelular), adicionalmente pode haver absorção através dos folículos pilosos. Ao nível das membranas mucosas os OE podem ser absorvidos pela boca, vagina e reto, sendo que este tipo de aplicação permite a ação localizada (exemplo: tratamento de infeções bucais), no entanto a dose tem de ser adequada de modo a não criar irritação pois as membranas mucosas são extremamente sensíveis⁵⁸.

Quando os OE são inalados a absorção dá-se ao longo do epitélio olfativo e nos alvéolos pulmonares, dependendo da lipofilicidade dos OE, do ritmo e profundidade da respiração e da velocidade do fluxo sanguíneo nos pulmões. Alguns compostos dos OE conseguem interagir com recetores dos bulbos olfativos e afetar o comportamento e a psique, estes efeitos podem ser usados em aromaterapia para, por exemplo, tratar desordens do sono e reduzir a ansiedade. Quando a absorção se dá por esta via os compostos conseguem chegar ao sistema nervoso central e, por este motivo, é necessário ter atenção à presença de neurotóxicos⁵⁸.

Quando os OE são ingeridos as doses podem ser maiores, no entanto é preciso haver um maior cuidado. A absorção depende da presença de outras substâncias no estômago, como alimentos ou medicamentos. Os OE podem causar irritação da mucosa estomacal, assim só devem ser ingeridos se estiverem diluídos (exemplo: diluição em óleos comestíveis) ou encapsulados, para além disso as enzimas digestivas gástricas podem degradar e converter os compostos dos OE a metabolitos com propriedades alteradas⁵⁸.

Após a absorção, os compostos são transportados no plasma pela albumina e podem ser logo metabolizados, ou absorvidos pelos órgãos e tecido adiposo, de onde serão lentamente removidos à medida que se dá a metabolização. Certos compostos podem persistir durante algum tempo no tecido adiposo. Existem vários tecidos envolvidos na metabolização dos OE, nomeadamente o fígado, que é o principal responsável, a pele, os rins, os pulmões, as glândulas adrenais, o tecido nervoso, o plasma sanguíneo, a mucosa intestinal e a placenta. A metabolização dos OE é complexa pois envolve cada um dos seus compostos individuais, os quais têm de passar várias fases de transformação (exemplos: hidrólise, oxidação e glucoronidação), havendo o risco de se converterem a metabolitos tóxicos. Após a metabolização, os OE são excretados, através do trato respiratório, pele e rins, ou secretados para o intestino para serem usados na fermentação microbiana^{58,66}.

Apesar dos OE serem geralmente reconhecidos como seguros, já foram reportadas reações tóxicas graves como abortos, anormalidades durante a gravidez, convulsões, estenose do esófago, falência renal, ginecomastia pré-púbere, hepatotoxicidade, hiperatividade bronquial, instabilidade cardiovascular, neurotoxicidade, paragem cardíaca, paragem respiratória, rabiólise e telarca prematura^{59,60}. Assim, é necessário encontrar um equilíbrio entre efetividade e toxicidade, o qual depende da composição química de cada OE e da concentração aplicada^{70,71}.

1.5.6 Aplicação na indústria alimentar

Na indústria alimentar o embalamento dos alimentos é essencial para impedir a contaminação química e microbiana e a exposição a fatores ambientais, no entanto a produção em massa de embalagens, usando materiais como plástico, metal, papel e vidro torna esta indústria numa das mais poluidoras. Além do grande desperdício de materiais, certas embalagens contêm compostos prejudiciais, como o bisfenol A, que podem ser transferidos para os alimentos num processo denominado por migração, assim é necessário o desenvolvimento de alternativas às embalagens clássicas^{70,72}. O embalamento ativo é uma alternativa promissora e caracteriza-se pela incorporação de compostos bioativos em embalagens biodegradáveis ou não-degradáveis. Estes compostos podem ter a função de remover (exemplos: absorvedores de oxigénio e de etileno) ou de emitir (exemplos: emissores de dióxido de carbono, agentes antioxidantes e antimicrobianos) substâncias, de modo a prevenir alterações indesejáveis nos alimentos^{70,73,74}. Os absorvedores de oxigénio (exemplos: ferro e ácido ascórbico) reagem com o oxigénio de modo a diminuir a sua concentração dentro das embalagens, uma vez que a presença de oxigénio leva à oxidação dos alimentos e permite o crescimento de

microrganismos aeróbios. Estes compostos são usados, por exemplo, em embalagens de pizza, queijo, peixe e café. Os absorvedores de etileno (exemplo: permanganato de potássio em suporte de sílica gel) removem o etileno da atmosfera circundante de produtos frescos durante o seu manuseamento, transporte e armazenamento, isto é necessário pois o etileno age como uma fito-hormona responsável pelo amadurecimento e senescência de frutas e legumes. Os emissores de dióxido de carbono (exemplo: combinação de bicarbonato de sódio com ácido cítrico) baseiam-se na libertação de dióxido de carbono para a atmosfera dos alimentos, pois este possui propriedades antimicrobianas, contribuindo para a preservação da qualidade e para o aumento do tempo de prateleira dos alimentos. Estes compostos são usados, por exemplo, em embalagens de vegetais, carnes frescas e peixe⁷⁵.

Os compostos bioativos dos OE fazem destes uma excelente opção natural para aplicar em embalagens ativas e a sua incorporação pode ser feita diretamente ou através de sistemas de encapsulamento⁷³. Recorrer a sistemas de encapsulamento, como nanoemulsões, nanopartículas lipídicas sólidas, lipossomas e nanofibras, pode ser necessário uma vez que a incorporação direta de OE apresenta as seguintes limitações: distribuição heterogénea dos OE em meios aquosos devido à sua hidrofobicidade, alteração das propriedades organoléticas dos alimentos, ocorrência de transformações químicas na composição dos OE, instabilidade de certos compostos a variações de pH e aceleração da oxidação dos OE devido às condições de processamento ou armazenamento (exemplo: exposição a luz UV)^{19,57}.

Atualmente, a incorporação dos OE é feita principalmente em filmes e revestimentos comestíveis (FRC), os filmes são pré-fabricados e embutidos no alimento, já os revestimentos são preparados através da aplicação de um fluido viscoso diretamente na superfície do alimento^{72,73}. Os FRC são constituídos por quatro componentes: matrizes poliméricas, aditivos, plastificantes e solventes. As matrizes são formadas por polissacarídeos (exemplos: amido e quitosano), proteínas (exemplos: gelatina e caseína), lípidos, ceras e resinas. A estas matrizes, são adicionados aditivos como compostos antioxidantes e antimicrobianos, nutrientes, emulsionantes, fragrâncias, probióticos, etc. Os plastificantes (exemplos: glicerol e xilitol) diminuem as forças intermoleculares entre as cadeias do polímero, permitem maiores variações de temperatura, fornecem flexibilidade e resistência aos FRC. Os solventes são o meio onde se misturam todos os componentes e geralmente usam-se soluções aquosas de etanol com diferentes concentrações⁷².

A substituição de embalagens clássicas por FRC é vantajosa pois, para além de serem biodegradáveis, estes melhoram as propriedades nutricionais e organoléticas dos alimentos, possibilitam o embalamento individual de produtos e as suas matrizes podem

ser produzidas a partir de sub-produtos de várias atividades (exemplo: agricultura), contribuindo para a redução do desperdício⁷². O principal problema associado aos FRC é a existência de fatores que podem alterar as interações entre os compostos bioativos e os alimentos. Estes fatores podem ser intrínsecos ao alimento (a_w , aditivos, sal, pH, conteúdo de gordura e proteína) ou extrínsecos (temperatura de armazenamento e composição da atmosfera)⁷³.

1.5.7 Palmarosa

A palmarosa, *Cymbopogon martinii* (Roxb.) W. Watson, é uma planta perene do género *Cymbopogon* e da família *Poaceae*, que é nativa da Índia e Turquia e está distribuída em regiões tropicais e sub-tropicais⁷⁶⁻⁷⁹. Esta tem entre 5-8 metros de altura, caules finos e compridos, amplas folhas e apresenta inflorescência (Figura 1)^{79,80}.

A palmarosa é usada na indústria de perfumes, no tratamento de diabetes e possui propriedades diuréticas e atividade anti-inflamatória⁸¹. O seu OE não é tóxico, é amarelo pálido e o seu odor é semelhante a rosas. Este OE é usado como aroma de alimentos e bebidas, em produtos farmacêuticos e de cosmética, em perfumes e apresenta propriedades repelentes e atividade citotóxica, antioxidante e antimicrobiana^{77,78,82}.



Figura 1- Palmarosa: A- Planta; B- Inflorescência.

1.5.8 Bergamota

A bergamota, *Citrus aurantium* ssp. *bergamia* (Risso et Poiteau) Wight & Arn. Ex Engler, é uma árvore perene do género *Citrus* e da família *Rutaceae*, que cresce quase exclusivamente em Calabria, na Itália^{83,84}. Esta tem até 5 metros de altura, um caule castanho-acinzentado cilíndrico, ramos irregulares, folhas persistentes, simples e alternadas, inflorescência racemosa, com várias flores de pétalas brancas e o fruto (hesperídio), cuja casca apresenta 3-6 mm de espessura, pode ser lisa ou rugosa e tem cor verde, que se altera para amarelo pálido quando o fruto está maduro (Figura 2)⁸⁵.

O fruto é usado para confeccionar sobremesas, sumos e compota, no entanto cerca de metade é desperdiçado (casca, sementes e polpa). Estes subprodutos podem ser usados na produção de OE, principalmente a casca, que possui várias glândulas contendo o OE^{84,85}.

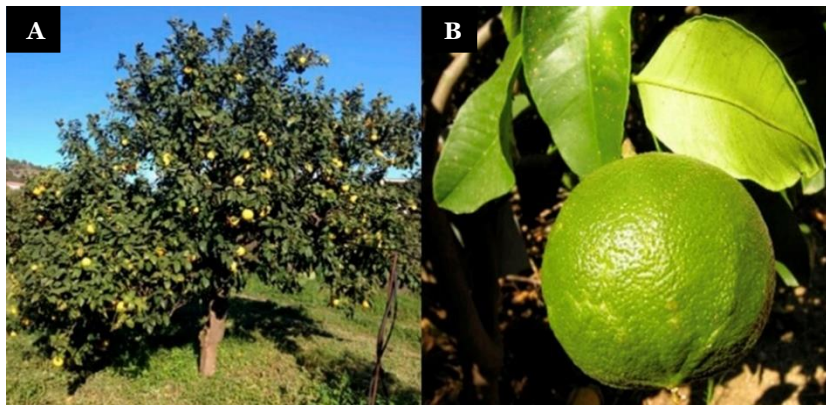


Figura 2- Bergamota: A- Árvore; B- Fruto.

O OE de bergamota é usado nas indústrias alimentar, farmacêutica, de cosmética e de perfumaria. Além disso, age como curativo de feridas e sedativo, tem ação calmante e possui atividade neuroprotetora, antioxidante, antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória, anticâncer e de alívio da dor^{84,86}.

Este OE tem cor verde ou amarelo-acastanhado e um odor agradável característico, no entanto, apresenta fototoxicidade, devido à presença de furanocumarinas do tipo bergapteno, o que pode gerar pigmentação crônica na pele e carcinogênese na presença de luz UV. Assim, este só deve ser usado nas indústrias farmacêutica e de cosmética, após ser retificado, pois não apresenta efeito tóxico na ausência de furanocumarinas⁸⁶⁻⁸⁸.

1.5.9 Esteva

A esteva, *Cistus ladanifer* L, é um arbusto perene do género *Cistus* e da família *Cistaceae* encontrado em zonas selvagens vastamente distribuído em Portugal, Marrocos, Argélia, Espanha e Itália⁸⁹⁻⁹¹. A esteva germina entre o Outono e o Inverno, no entanto, apenas os arbustos com 3-4 anos florescem, entre Março e Maio. Os seus ramos podem crescer até 2 metros de altura e as suas flores são largas (64 mm de diâmetro), brancas e têm uma duração máxima de 3 dias (Figura 3). A esteva cresce em vários climas, é muito resistente ao frio, seca e temperaturas elevadas e consegue crescer em solos degradados e pouco férteis^{90,92,93}.

A esteva possui atividade anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana, antiulcerogénica, antitumoral, antiespasmódica e vasodilatadora⁹⁰⁻⁹². Esta produz dois produtos de interesse, o OE e uma resina (lábdano), extraída do caule e folhas e aplicada

na indústria de perfumes devido às suas propriedades fixadoras e ao seu odor duradouro⁹².

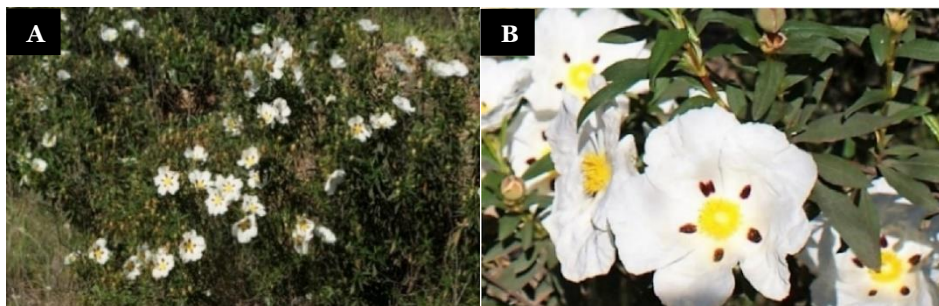


Figura 3- Esteva: A- Arbusto; B- Flores.

O OE de esteva não é tóxico, é amarelo e o seu odor varia dependendo dos compostos presentes, exemplos de descrições são odor floral, cítrico, amadeirado, a ervas e a mentol^{92,94}. Este possui atividade antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, analgésica, gastroprotetora, antidiarreica, antiagregante plaquetária, antiespasmódica, antitumoral, antiácido e antiulcerogénica^{90,92}.

1.5.10 Funcho

O funcho, *Foeniculum vulgare* Mill, é uma erva perene resistente do género *Foeniculum* e da família *Apiaceae*, que está distribuída pelo mundo inteiro, mas pensa-se ser nativa da área Mediterrânea^{95,96}. O funcho pode crescer até 2 metros de altura, possui caule verde, vários ramos, folhagem contendo 3-4 folhas pinadas com uma espécie de penugem, pequenas flores amarelas e um fruto alongado (Figura 4)^{96,97}.

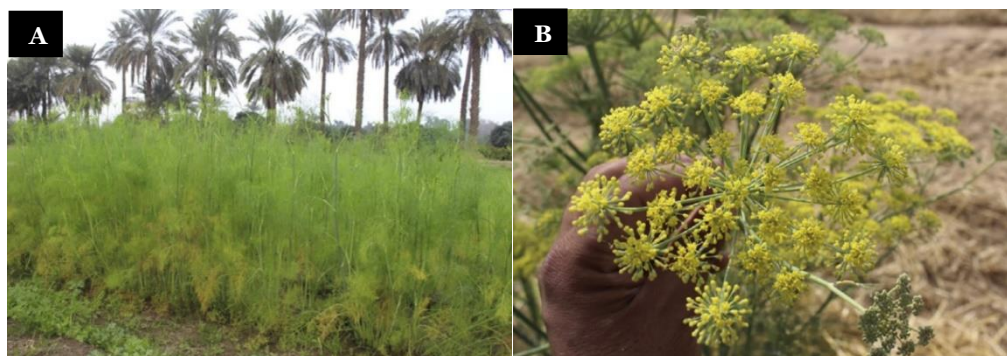


Figura 4- Funcho: A- Erva; B- Flores.

O funcho é usado em produtos alimentares, como especiaria, em produtos de cosmética e na indústria farmacêutica, como agente aromático. Na medicina tradicional é usado no tratamento de distúrbios dos sistemas digestivo e respiratório, diabetes, pedras nos rins e dismenorreia. Age como galactogogo, digestivo, expectorante, carminativo, diurético, antisséptico e estimulante e apresenta atividade antidiabética, antitrombótica,

ansiolítica, antioxidante, antimicrobiana, anticâncer, anti-inflamatória, antiespasmódica, gastroprotetora, hepatoprotetora e de proteção da memória^{95,96,98}.

O OE de funcho não é tóxico em concentrações bioativas, pode ser transparente ou amarelo pálido e apresenta aroma de anis^{95,99}. Este age como carminativo, possui propriedades inseticidas e possui atividade estrogénica, ansiolítica, antidiabética, antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, anticâncer, antiespasmódica, antitrombótica e hepatoprotetora^{96,100}.

1.6 Avaliação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante de um composto está relacionada com a sua estrutura. Os compostos conhecidos por apresentarem atividade antioxidante são os terpenos com ligações duplas conjugadas e os compostos fenólicos, sendo que os que têm mais que um grupo hidroxilo (-OH) apresentam maior atividade. Nos compostos fenólicos que têm mais que um grupo hidroxilo, a atividade é maior quando estes se encontram nas posições *para* e *orto*. A atividade também aumenta quando os compostos fenólicos têm grupos metoxilo (-OCH₃) na posição *orto*. Adicionalmente, foi relatado que os grupos hidroxilo e metoxilo têm efeito doador de eletrões, quando se encontram na posição *para*, e efeito atrator de eletrões, quando se encontram na posição *meta*^{53,101-104}.

Os métodos de avaliação de atividade antioxidante podem basear-se na transferência de um átomo de hidrogénio (TAH), na transferência de um único eletrão (TUE) e numa mistura dos dois (TAH/TUE). Os métodos TAH avaliam a capacidade de um antioxidante remover radicais livres doando um átomo de hidrogénio e os métodos TUE avaliam a capacidade de um antioxidante transferir um eletrão, de modo a reduzir iões metálicos, grupos carbonilo e radicais livres¹⁰⁵.

1.6.1 Ensaio do sequestro do radical livre DPPH

O ensaio do sequestro do radical livre DPPH classifica-se como TAH/TUE. Este é um ensaio colorimétrico, que avalia a capacidade de um antioxidante reduzir, doando um ião H⁺, o radical livre sintético DPPH. A formação de DPPH-H é acompanhada pela redução da absorvência ($\lambda=517$ nm) e pela descoloração de roxo para amarelo (Figura 5). Assim, quando avaliada por este ensaio, a atividade antioxidante de um composto é tanto maior quanto maior for a descoloração e a redução da absorvência (medida num espetrofotómetro). O radical livre DPPH é insolúvel em água e solúvel em metanol, etanol e nas suas misturas aquosas (o conteúdo de água não deve exceder os 60%)¹⁰⁵⁻¹⁰⁷.

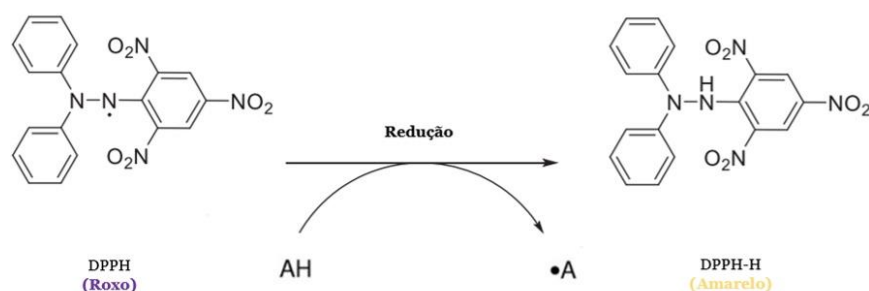


Figura 5- Reação de redução do radical livre DPPH a DPPH-H, por um antioxidante (AH) que se oxida (•A).

1.6.2 Ensaio da descoloração do β -caroteno

O ensaio da descoloração do β -caroteno permite avaliar a efetividade de um antioxidante na inibição da peroxidação lipídica em alimentos na forma de emulsões óleo-em-água (exemplos: leite e maionese)⁵⁴.

Numa emulsão, quando o ácido linoleico é oxidado forma-se o radical peróxido, que induz auto-oxidação dos carotenoides (cor amarela, laranja ou vermelha), originando a sua descoloração (Figura 6). A descoloração dos carotenoides é inibida quando se encontram na presença de antioxidantes. Assim, a efetividade do antioxidante é calculada a partir da medição espectrofotométrica ($\lambda=470$ nm) da descoloração do β -caroteno, tanto na ausência como na presença do antioxidante, e será tanto maior quanto menor for a descoloração na presença do antioxidante. O β -caroteno é praticamente insolúvel em água e pouco solúvel em metanol, acetonitrilo e dimetilsulfóxido (DMSO). Este é solúvel em clorofórmio, hexano, diclorometano e tetrahidrofurano (maior solubilidade)^{54,106,108-110}.

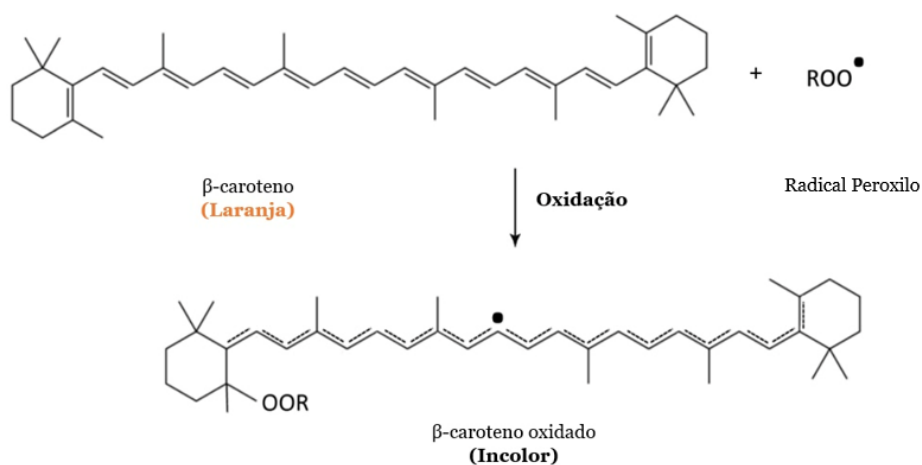


Figura 6- Reação de oxidação do carotenoide β -caroteno, por um radical peróxido (ROO•).

1.7 Avaliação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana de um composto está relacionada com a sua estrutura e é maior em compostos mais hidrofóbicos e que apresentem ligações duplas. Além disso os compostos fenólicos e compostos contendo grupos hidroxilo apresentam maiores atividades antimicrobianas⁷.

1.7.1 Ensaio da difusão em disco

O ensaio da difusão em disco é um método simples, de baixo custo, que permite avaliar a suscetibilidade de microrganismos a vários compostos e facilmente interpretar os resultados. Este baseia-se no uso de meios de cultura e condições de incubação específicas e na aplicação do composto em estudo em discos de papel de filtro com 6 mm de diâmetro, de modo a difundir para o agar inoculado com o microrganismo em estudo. A difusão do composto inibe o crescimento do microrganismo, gerando um halo de inibição, cujo diâmetro é medido (Figura 7). No entanto, como a inibição do crescimento microbiano não indica a morte microbiana, este método não consegue distinguir efeitos bactericidas de efeitos bacteriostáticos. Além disso, não é possível determinar a CMI do composto em estudo, pois não se consegue quantificar a quantidade de composto antimicrobiano que difundiu para o agar¹¹¹.



Figura 7- Avaliação da suscetibilidade da bactéria *Listeria monocytogenes* LMG 16779 ao OE de palmarosa pelo ensaio da difusão em disco.

1.7.2 Ensaio da microdiluição utilizando a resazurina como indicador de crescimento

O ensaio da microdiluição utilizando a resazurina como indicador de crescimento permite saber qual a concentração mínima de um composto antimicrobiano que inibe o crescimento de microrganismos. Este é um ensaio colorimétrico que usa uma placa de

96 poços onde são aplicadas várias concentrações dos compostos em estudo e usa a resazurina como indicador de viabilidade celular. A resazurina apresenta cor azul e, quando na presença de células metabolicamente ativas, é reduzida (provavelmente devido à ação da NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) desidrogenase) irreversivelmente ao composto resorufina, que tem cor rosa fluorescente (Figura 8). Após a resazurina ser totalmente reduzida a resorufina, esta pode ainda ser reduzida, reversivelmente, a dihidroresorufina, que é incolor. Assim, este método permite determinar qual a CMI de um composto, observando quais os poços em que não houve alteração da cor de azul para rosa/incolor^{112,113}.

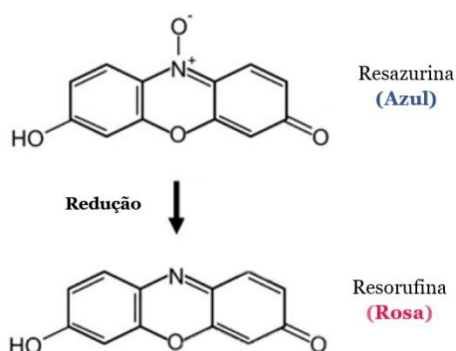


Figura 8- Reação de redução da resazurina a resorufina.

Capítulo 2- Objetivo

O objetivo desta dissertação foi avaliar as atividades antioxidantes e antimicrobianas de combinações binárias, ternárias e quaternária dos óleos essenciais de *Cymbopogon martinii*, *Citrus aurantium* ssp. *bergamia*, *Cistus ladanifer* e *Foeniculum vulgare*, usando o ensaio do sequestro do radical livre DPPH, o ensaio da descoloração do β -caroteno, o ensaio da difusão em disco e o ensaio da microdiluição utilizando a resazurina como indicador de crescimento. Estas avaliações foram feitas com o intuito de se obterem interações de sinergismo entre os óleos essenciais, de modo a serem usados como conservantes naturais na indústria alimentar.

Capítulo 3- Materiais e Métodos

3.1 Óleos essenciais

Para os ensaios foram usados OE comerciais de *Cymbopogon martinii* (palmarosa), *Citrus aurantium ssp. bergamia* (bergamota), *Cistus ladanifer* (esteva) e *Foeniculum vulgare* (funcho), pois já foi reportado que estes apresentam atividades antioxidante e antimicrobiana.

O OE de palmarosa (Physalis, Oostkamp, Bélgica) foi extraído por hidrodestilação das folhas de *Cymbopogon martinii*, colhida no Nepal. O OE de bergamota (Physalis, Oostkamp, Bélgica) foi extraído por prensagem a frio da casca do fruto de *Citrus aurantium ssp. bergamia*, colhida em Itália. O OE de esteva (Herdade de Vale Côvo, Mértola, Portugal) foi extraído, por destilação por arrastamento de vapor, das folhas de *Cistus ladanifer*, colhida em Portugal. O OE de funcho (Herdade de Vale Côvo, Mértola, Portugal) foi extraído, por destilação por arrastamento de vapor, das folhas e flores de *Foeniculum vulgare*, colhido em Portugal.

A partir destes OE, foram preparadas combinações binárias e ternárias e uma combinação quaternária, com proporções iguais de cada OE: palmarosa + bergamota, palmarosa + esteva, palmarosa + funcho, bergamota + esteva, bergamota + funcho, esteva + funcho, palmarosa + bergamota + esteva, palmarosa + bergamota + funcho, palmarosa + esteva + funcho, bergamota + esteva + funcho e palmarosa + bergamota + esteva + funcho.

3.2 Determinação da composição química dos óleos essenciais

A determinação da composição química foi feita pelo laboratório ChromEssence (La Garriga, Barcelona, Espanha) (<https://chromessence.com/>, acessido a 24 de março de 2023). Os compostos foram identificados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM), processados pelo modo “cromatograma de iões totais” e quantificados por cromatografia gasosa acoplada a detetor de ionização à chama (CG-DIC), usando a percentagem de área relativa.

Seguiu-se o método da organização internacional para padronização (ISO) 7609 (Vernier, Genebra, Suíça) e trabalhou-se com um cromatógrafo gasoso com detetor de ionização de chama Agilent 7820A (Santa Clara, Califórnia, Estados Unidos da América)

e com um detetor seletivo de massa Agilent MS 5977B (Santa Clara, Califórnia, Estados Unidos da América). Para a fase móvel usou-se gás hélio com pressão constante de 25,5 Psi (CG-EM) e de 33Psi (CG-DIC). Como fase estacionária usou-se uma coluna capilar de polietilenoglicol com 60 m × 0,25 mm × 0,5 µm, para o OE de esteva usou-se a Agilent HP-INNOWax (Santa Clara, Califórnia, Estados Unidos da América), para os OE de palmarosa, bergamota e funcho usou-se a Agilent DB-WAX Ultra Inert (Santa Clara, Califórnia, Estados Unidos da América).

As amostras foram injetadas num volume de 0,1 µL em modo *split* num intervalo de massa de 33-350 m/z e a temperatura do forno foi programada para 6 minutos a 50°C, 2°C/minuto até 190°C, 4°C/minuto até 220°C, 10 minutos a 220°C, 4°C/minuto até 250°C e 10 minutos a 250°C.

A percentagem (%) relativa de cada composto foi calculada a partir da percentagem de área relativa do seu pico no cromatograma. Assim, calculou-se a percentagem de área relativa total, correspondente a 100% da área de todos os picos do cromatograma e a partir da percentagem de área relativa de cada composto calculou-se a sua percentagem relativa.

3.3 Avaliação da atividade antioxidante

3.3.1 Ensaio do sequestro do radical livre DPPH

3.3.1.1 Óleos essenciais

Começou-se por preparar várias diluições metanólicas (0,25; 0,5; 1,25; 2,5; 3,75 e 5 % v/v) de OE e soluções metanólicas de DPPH (TCI, Zwijndrecht, Bélgica) de diferentes concentrações (0,08 mM, 0,1242 mM e 0,2 mM)¹¹⁴.

Em tubos de ensaio, adicionaram-se 100 µL das respetivas concentrações de OE e 3,9 mL de cada solução metanólica de DPPH. Trabalhou-se com duplicados e foram preparados controlos negativos, contendo 100 µL de metanol (Fisher Chemical, Loughborough, Inglaterra) e 3,9 mL de cada solução metanólica de DPPH. Os tubos foram levados ao vortex Maxi Mix II (Barnstead International, Dubuque, Iowa, Estados Unidos da América) e deixados no escuro, a temperatura ambiente, durante 90 minutos. Após este período, os tubos foram novamente levados ao vortex e as suas absorvências foram medidas num espectrofotómetro UV-Vis Helios Gamma (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos da América) a 517 nm, usando metanol como branco¹¹⁴.

O ensaio foi repetido para o controlo positivo, ácido gálico (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos da América), e neste as diluições metanólicas de OE foram substituídas por diluições metanólicas de ácido gálico (25, 50, 100, 150, 200 e 250 mg/L)¹¹⁴.

A partir deste ensaio determinou-se a concentração que gera 50% de inibição (CI₅₀) do radical livre DPPH, obtida graficamente a partir de curvas de calibração lineares da percentagem (%) de inibição (1) em função da concentração dos OE (% v/v) e do ácido gálico (% m/v). Também se calculou o Índice de Atividade Antioxidante (IAA) (2), para o qual o valor da concentração final de DPPH no controlo negativo foi obtido por uma curva de calibração da absorvência ($\lambda=517$ nm) em função da concentração de DPPH (mg/L)¹¹⁴.

$$(1) \text{ inibição (\%)} = \frac{A_{\text{controlo}} - A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controlo}}} \times 100$$

Na equação (1), A_{controlo} corresponde à absorvência do controlo negativo e A_{amostra} corresponde à absorvência dos tubos com OE/ácido gálico.

$$(2) \text{ IAA} = \frac{[\text{DPPH final}]}{\text{CI}_{50}}$$

Na equação (2), [DPPH final] corresponde à concentração final de DPPH no controlo negativo e CI₅₀ corresponde à concentração que gera 50% de inibição do radical livre DPPH. A atividade antioxidante dos OE/ácido gálico foi classificada como: fraca, quando $\text{IAA} \leq 0,5$; moderada, quando $0,5 < \text{IAA} \leq 1,0$; forte, quando $1,0 < \text{IAA} < 2,0$; muito forte, quando $2 \leq \text{IAA}$.

3.3.1.2 Combinações de óleos essenciais

Começou-se por preparar uma solução metanólica de DPPH (TCI, Zwijndrecht, Bélgica) com concentração 0,1 mM¹¹⁵.

Em tubos de ensaio adicionaram-se 100 μL de cada OE/combinção e 3,9 mL da solução metanólica de DPPH (0,1 mM). Trabalhou-se com triplicados e foram preparados controlos negativos, contendo 100 μL de metanol (Fisher Chemical, Loughborough, Inglaterra) e 3,9 mL de solução metanólica de DPPH (0,1 mM). Os tubos foram levados ao vortex Maxi Mix II (Barnstead International, Dubuque, Iowa, Estados Unidos da América) e deixados no escuro, a temperatura ambiente, durante 15 minutos. Após este período, os tubos foram novamente levados ao vortex e as suas absorvências foram lidas

num espectrofotómetro UV-Vis Helios Gamma (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos da América) a 517 nm, usando metanol como branco¹¹⁵. Adicionalmente, foram preparados tubos de ensaio contendo 100 µL de cada OE/combinção e 3,9 mL de metanol. As absorvências destes tubos foram medidas no espectrofotómetro UV-Vis a 517 nm (A_{branco}), usando metanol como branco¹¹⁵.

A partir deste ensaio foram determinadas as percentagens (%) de inibição (3) do radical livre DPPH originadas pelos OE/combinções e foram determinadas as interações entre os OE. Para as combinações binárias, as interações foram determinadas pelo efeito sinérgico (ES) (6), através dos valores de capacidade de sequestro experimental (CSE) (4) e de capacidade de sequestro teórica (CST) (5) das combinações, e foi ainda feita uma análise estatística, usando o programa SPSS versão 24, onde se calculou o intervalo de confiança 95% para as médias do ES.¹¹⁵ Para as combinações ternárias e quaternária as interações foram determinadas pela percentagem (%) de diferença (7) e (8)¹⁰³.

$$(3) \text{ inibição (\%)} = \frac{A_{\text{controlo}} - A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controlo}}} \times 100$$

Na equação (3), A_{controlo} corresponde à absorvência do controlo negativo e A_{amostra} corresponde à absorvência dos tubos com OE/combinções.

$$(4) \text{ CSE} = 100 - \frac{(A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco}}) \times 100}{A_{\text{controlo}}}$$

Na equação (4) A_{controlo} corresponde à absorvência do controlo negativo, A_{amostra} corresponde à absorvência dos tubos com OE/combinções e A_{branco} corresponde à absorvência das soluções metanólicas de OE/combinções.

$$(5) \text{ CST(mistura)} = (CSE(A) + CSE(B)) - \frac{CSE(A) \times CSE(B)}{100}$$

Na equação (5) CSE (A) e CSE (B) representam os valores de capacidade de sequestro experimental dos OE, A e B, presentes em cada combinação binária.

$$(6) \text{ ES} = \frac{CSE(\text{mistura})}{CST(\text{mistura})}$$

Na equação (6), CSE (mistura) representa a capacidade de sequestro experimental das combinações e CST (mistura) representa a capacidade de sequestro teórica das

combinações. As interações entre OE foram classificadas como: antagonismo, quando $ES < 1$; adição, quando $ES \approx 1$; sinergismo, quando $1 < ES$.

$$(7) \text{ diferença}(\%) = \frac{\text{inibição}(\%)(\text{mistura}) \times 100}{\text{inibição}(\%)(A) + \text{inibição}(\%)(B) + \text{inibição}(\%)(C)} - 100$$

Na equação (7), inibição (%) (mistura) corresponde à percentagem (%) de inibição do radical livre DPPH originada pelas combinações ternárias e inibição (%) (A), inibição (%) (B) e inibição (%) (C) correspondem à percentagem (%) de inibição do radical livre DPPH originada pelos OE, A, B e C presentes em cada combinação ternária.

$$(8) \text{ diferença}(\%) = \frac{\text{inibição}(\%)(\text{mistura}) \times 100}{\text{inibição}(\%)(A) + \text{inibição}(\%)(B) + \text{inibição}(\%)(C) + \text{inibição}(\%)(D)} - 100$$

Na equação (8), inibição (%) (mistura) corresponde à percentagem (%) de inibição do radical livre DPPH originada pela combinação quaternária e inibição (%) (A), inibição (%) (B), inibição (%) (C) e inibição (%) (D) correspondem à percentagem (%) de inibição do radical livre DPPH originada pelos OE, A, B, C e D presentes na combinação quaternária. As interações entre OE foram classificadas como: antagonismo, quando diferença (%) < 0; adição, quando diferença (%) $\approx 0 \pm 5\%$; sinergismo, quando $0 < \text{diferença}(\%)$.

3.3.2 Ensaio da descoloração do β -caroteno

3.3.2.1 Óleos essenciais

Começou-se por preparar várias diluições metanólicas (0,25; 0,5; 1,25; 2,5; 3,75 e 5 % v/v) de OE e uma solução mãe de β -caroteno (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos da América) dissolvido em clorofórmio (Pronalab, Lisboa, Portugal) (500 mg/mL)¹⁴.

Prepararam-se duas emulsões (branco e β -caroteno), para a emulsão do branco misturou-se 1,5 mL de clorofórmio, 40 μ L de ácido linoleico (Alfa Aesar, Kandel, Alemanha) e 400 μ L de Polissorbato 40 (Tween 40) (Alfa Aesar, Kandel, Alemanha) e para a emulsão do β -caroteno misturou-se 1,25 mL de solução mãe de β -caroteno (500 mg/mL), 100 μ L de ácido linoleico, 1 mL de Tween 40 e 2,5 mL de clorofórmio. As misturas foram levadas a um rotavapor com banho (BÜCHI, Flawil, Suíça) a 45°C durante 5 minutos. Após este período, adicionou-se lentamente às misturas água destilada fria previamente saturada com oxigénio, 100 mL para a emulsão do branco e

250 mL para a emulsão de β -caroteno, e agitou-se vigorosamente, de modo a formar as emulsões¹¹⁴.

Em tubos de ensaio adicionaram-se 300 μ L das respetivas concentrações de OE e 5 mL de emulsão de β -caroteno. Trabalhou-se em duplicado e foram preparados controlos negativos, contendo 300 μ L de metanol (Fisher Chemical, Loughborough, Inglaterra) e 5 mL de emulsão de β -caroteno. Foi preparado um tubo para o branco, contendo 300 μ L de metanol e 5 mL de emulsão do branco. Os tubos foram levados ao vortex Maxi Mix II (Barnstead International, Dubuque, Iowa, Estados Unidos da América) e as absorvências dos controlos (t=0h) foram medidas num espectrofotómetro UV-Vis Helios Gamma (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos da América) a 470 nm, usando o tubo do branco como branco. Todos os tubos de ensaio foram colocados num banho GLS Aqua 18 Plus (Grant instruments, Cambridgeshire, Inglaterra) a 50°C durante 2 horas. Após as 2 horas, os tubos foram novamente levados ao vortex e todas as absorvências (t=2h) foram medidas no espectrofotómetro UV-Vis a 470 nm, usando o tubo do branco como branco¹¹⁴.

O ensaio foi repetido para o controlo positivo, BHT (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos da América), as diluições metanólicas de OE foram substituídas por várias diluições metanólicas de BHT (25, 50, 100, 150, 200 e 250 mg/L)¹¹⁴.

A partir deste ensaio determinou-se a concentração que gera 50% de inibição (CI_{50}) da descoloração do β -caroteno, obtida graficamente a partir de curvas de calibração lineares da percentagem (%) de inibição (6) em função da concentração dos OE (% v/v) e do BHT (% m/v)¹¹⁴.

$$(9) \% \text{inibição} = \frac{A_{\text{amostra}}(t=2h) - A_{\text{controlo}}(t=2h)}{A_{\text{controlo}}(t=0h) - A_{\text{controlo}}(t=2h)} \times 100$$

Na equação (9), $A_{\text{controlo}}(t=0h)$ corresponde à absorvência do controlo negativo no tempo inicial, $A_{\text{controlo}}(t=2h)$ corresponde à absorvência do controlo negativo após a incubação e $A_{\text{amostra}}(t=2h)$ corresponde à absorvência dos tubos com OE/BHT após a incubação.

3.3.2.2 Combinações de óleos essenciais

Começou-se por preparar uma solução mãe de β -caroteno (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos da América) dissolvido em clorofórmio (Pronalab, Lisboa, Portugal) (100 mg/mL) e prepararam-se diluições metanólicas (1% v/v) dos OE e das combinações.

Prepararam-se duas emulsões (β -caroteno e branco), para a emulsão do branco misturou-se 1,1 mL de clorofórmio, 40 μ L de ácido linoleico (Alfa Aesar, Kandel,

Alemanha) e 400 µL de Tween 40 (Alfa Aesar, Kandel, Alemanha) e para a emulsão do β-caroteno misturou-se 150 µL de solução mãe de β-caroteno (100 mg/mL), 60 µL de ácido linoleico, 600 µL de Tween 40 e 1,5 mL de clorofórmio. As misturas foram levadas a um rotavapor com banho (BÜCHI, Flawil, Suíça) a 45°C durante 5 minutos. Após os 5 minutos, adicionou-se lentamente às misturas água destilada fria previamente saturada com oxigénio, 100 mL para a emulsão do branco e 150 mL para a emulsão de β-caroteno, e agitou-se vigorosamente, de modo a formar as emulsões¹¹⁵.

Em tubos de ensaio adicionaram-se 300 µL das diluições metanólicas de OE/ combinações (1% v/v) e 5 mL de emulsão de β-caroteno. Trabalhou-se em triplicado e prepararam-se controlos negativos, contendo 300 µL de metanol (Fisher Chemical, Loughborough, Inglaterra) e 5 mL de emulsão de β-caroteno, e um tubo para o branco, contendo 300 µL de metanol e 5 mL de emulsão do branco¹¹⁵.

Os tubos foram levados ao vortex Maxi Mix II (Barnstead International, Dubuque, Iowa, Estados Unidos da América) e as absorvências dos controlos (t=0h) foram medidas num espectrofotómetro UV-Vis Helios Gamma (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos da América) a 470 nm, usando o tubo do branco como branco. Todos os tubos de ensaio foram colocados num banho GLS Aqua 18 Plus (Grant instruments, Cambridgeshire, Inglaterra) a 50°C durante 2 horas. Após as 2 horas, os tubos foram novamente levados ao vortex e todas as absorvências (t=2h) foram medidas no espectrofotómetro UV-Vis a 470 nm, usando o tubo do branco como branco¹¹⁵.

Adicionalmente, foram preparados tubos de ensaio contendo 300 µL das diluições metanólicas de OE/ combinações (1% v/v) e 5 mL de emulsão do branco. As absorvências destes tubos foram medidas no espectrofotómetro UV-Vis (A_{branco}) a 470 nm, usando o tubo do branco como branco¹¹⁵.

A partir deste ensaio foram determinadas as percentagens (%) de inibição (10) da descoloração do β-caroteno originadas pelos OE/combinções e foram determinadas as interações entre os OE. Para as combinações binárias as interações foram determinadas pelo efeito sinérgico (ES) (13), através dos valores de capacidade de sequestro experimental (CSE) (11) e de capacidade de sequestro teórica (CST) (12) das combinações, e foi ainda feita uma análise estatística, usando o programa SPSS versão 24, onde se calculou o intervalo de confiança 95% para as médias do ES.¹¹⁵ Para as combinações ternárias e quaternária as interações foram determinadas pela percentagem (%) de diferença (14) e (15)¹⁰³.

$$(10) \% \text{inibição} = \frac{A_{\text{amostra}}(t=2h) - A_{\text{controlo}}(t=2h)}{A_{\text{controlo}}(t=0h) - A_{\text{controlo}}(t=2h)} \times 100$$

Na equação (10) $A_{\text{controle}} (t=0h)$ corresponde à absorvência do controlo negativo no tempo inicial, $A_{\text{controle}} (t=2h)$ corresponde à absorvência do controlo negativo após a incubação e $A_{\text{amostra}} (t=2h)$ corresponde à absorvência dos tubos com OE/combinções após a incubação.

$$(11) \text{ CSE} = 100 - \frac{(A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco}}) \times 100}{A_{\text{controle}} (t=0h) - A_{\text{controle}} (t=2h)}$$

Na equação (11) $A_{\text{controle}} (t=0h)$ corresponde à absorvência do controlo negativo no tempo inicial, $A_{\text{controle}} (t=2h)$ corresponde à absorvência do controlo negativo após a incubação, A_{amostra} corresponde à absorvência dos tubos com OE/combinções após a incubação e A_{branco} corresponde à absorvência das diluições metanólicas de OE/combinções com emulsão do branco.

$$(12) \text{ CST(mistura)} = (\text{CSE}(A) + \text{CSE}(B)) - \frac{\text{CSE}(A) \times \text{CSE}(B)}{100}$$

Na equação (12) CSE (A) e CSE (B) representam os valores de capacidade de sequestro experimental dos OE, A e B, presentes em cada combinação binária.

$$(13) \text{ ES} = \frac{\text{CSE (mistura)}}{\text{CST (mistura)}}$$

Na equação (13), CSE (mistura) representa a capacidade de sequestro experimental das combinações e CST (mistura) representa a capacidade de sequestro teórica das combinações. As interações entre OE foram classificadas como: antagonismo, quando $\text{ES} < 1$; adição, quando $\text{ES} \approx 1$; sinergismo, quando $1 < \text{ES}$.

$$(14) \text{ diferença}(\%) = \frac{\text{inibição}(\%)(\text{mistura}) \times 100}{\text{inibição}(\%)(A) + \text{inibição}(\%)(B) + \text{inibição}(\%)(C)} - 100$$

Na equação (14), inibição (%) (mistura) corresponde à percentagem (%) de inibição da descoloração do β -caroteno originada pelas combinações ternárias e inibição (%) (A), inibição (%) (B) e inibição (%) (C) correspondem à percentagem (%) de inibição da descoloração do β -caroteno originada pelos OE, A, B e C presentes em cada combinação ternária.

$$(15) \text{ diferença}(\%) = \frac{\text{inibição}(\%)(\text{mistura}) \times 100}{\text{inibição}(\%)(A) + \text{inibição}(\%)(B) + \text{inibição}(\%)(C) + \text{inibição}(\%)(D)} - 100$$

Na equação (15), inibição (%) (mistura) corresponde à percentagem (%) de inibição da descoloração do β -caroteno originada pela combinação quaternária e inibição (%) (A), inibição (%) (B), inibição (%) (C) e inibição (%) (D) correspondem à percentagem (%) de inibição da descoloração do β -caroteno originada pelos OE, A, B, C e D presentes na combinação quaternária. As interações entre OE foram classificadas como: antagonismo, quando diferença (%) < 0; adição, quando diferença (%) $\approx 0 \pm 5\%$; sinergismo, quando $0 < \text{diferença} (\%)$.

3.4 Atividade antimicrobiana

3.4.1 Preparação dos meios de cultura e das culturas bacterianas

Trabalhou-se em condições de assepsia e foram preparados os meios de cultura e as culturas bacterianas¹¹⁴.

Relativamente à preparação dos meios sólidos, o meio MHA foi preparado misturando 19 g de Müller-Hinton agar (MHA) (VWR Chemicals, Leuven, Bélgica) com 500 mL de água destilada e o meio BHI foi preparado misturando 18,5 mL de caldo infusão de cérebro e coração (BHI) (Liofilchem, Téramo, Itália) com 10 g de agar (Grisp, Porto, Portugal) e 500 mL de água destilada. Relativamente à preparação dos meios líquidos, o meio MHB foi preparado misturando 10,5 g de caldo Müller-Hinton (MHB) (Liofilchem, Téramo, Itália) com 500 mL de água destilada e o meio BHI foi preparado misturando 18,5 mL de caldo infusão de cérebro e coração (BHI) com 500 mL de água destilada. Todos os meios foram autoclavados e os meios sólidos foram colocados em placas de Petri, onde ficaram a solidificar¹¹⁴.

Foram usadas 6 estirpes de bactérias, 3 Gram-positivas, *Listeria monocytogenes* LMG 16779, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e 3 Gram-negativas, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853¹¹⁴.

As bactérias foram cultivadas, nos respetivos meios de cultura (MHA para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e BHI para *Listeria monocytogenes* LMG 16779 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212), a partir de culturas stock armazenadas a -80°C em glicerol (20% v/v)¹¹⁴.

As bactérias foram sub-cultivadas, nos respetivos meios, e deixadas a incubar a 37°C , 24 horas antes de cada ensaio¹¹⁴.

3.4.2 Ensaio da difusão em disco

Para determinar a atividade antimicrobiana dos OE/combinções fez-se o ensaio da difusão em disco¹¹⁴.

Trabalhou-se em condições de assepsia. Discos de celulose com 6 mm de diâmetro foram impregnados com 15 µL de OE/combinções e preparou-se uma solução de cloreto de sódio (PanReac AppliChem ITW Reagents, Barcelona, Espanha) dissolvido em água destilada (0,85% m/v)¹¹⁴.

Os inóculos bacterianos foram preparados retirando com o auxílio de uma ansa algumas colónias isoladas (cultivadas no dia anterior) e misturando-as com a solução de cloreto de sódio, de modo a obter uma suspensão com densidade celular de 0,5 McFarland ($1-2 \times 10^8$ unidades formadoras de colónias/mL), medida num densitómetro de McFarland DEN-1 (Biosan, Riga, Letónia)¹¹⁴.

As suspensões foram usadas para inocular, com o auxílio de uma zaragatoa, as placas de Petri contendo meio MHA (suspensões de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) e meio BHI (suspensões de *Listeria monocytogenes* LMG 16779 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212). Esperou-se alguns segundos para que o inóculo secasse e os discos previamente preparados foram colocados por cima do agar, com o auxílio de uma pinça. Foram preparados controlos positivos, contendo tetraciclina (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos da América) (30 µg/disco), e controlos negativos, contendo DMSO (Fisher Chemical, Loughborough, Inglaterra) (15 µL/disco), para cada bactéria¹¹⁴.

As placas ficaram a incubar a 37°C durante a noite. No dia seguinte os halos de inibição foram observados e o seu diâmetro (mm) foi medido, usando um paquímetro digital. Este ensaio foi repetido 3 vezes independentes¹¹⁴.

A partir deste ensaio as interações entre os OE foram determinadas calculando o diâmetro dos halos de inibição dos OE/ combinções sem incluir o diâmetro do disco (6 mm) (DHISD) e a soma (Σ) do diâmetro dos halos de inibição dos OE sem o diâmetro do disco (6 mm) (Σ DHIOESD). As interações entre OE foram classificadas como: antagonismo, quando DHISD (combinções) < Σ DHIOESD; sinergismo, quando Σ DHIOESD < DHISD (combinções); indiferença quando os valores Σ DHIOESD se encontravam dentro do desvio padrão do DHISD (combinções)¹¹⁶.

Adicionalmente, as placas de Petri foram observadas por microscopia ótica, usando um microscópio Nikon Labophot-2 (Nikon, Tokyo, Japão) equipado com uma câmara Leica MC190HD (Leica, Wetzlar, Alemanha) e controlado pelo software LAS v4.13, de modo a observar os halos de inibição.

3.4.3 Ensaio da microdiluição utilizando a resazurina como indicador de crescimento

Para determinar os valores de CMI dos OE/combinções fez-se o ensaio da microdiluição utilizando a resazurina como indicador de crescimento¹¹⁴.

Trabalhou-se em condições de assepsia e começou-se por preparar duas soluções indicadoras, dissolvendo sal de sódio de resazurina (TCI, Zwijndrecht, Bélgica) (0,1% m/v) em meios MHB e BHI, e uma solução de cloreto de sódio (PanReac AppliChem ITW Reagents, Barcelona, Espanha) dissolvido em água destilada (0,85% m/v)¹¹⁴.

Prepararam-se 15 misturas contendo 64 µL de OE/ combinação, 40 µL de DMSO (Fisher Chemical, Loughborough, Inglaterra) e 896 µL de meio MHB, usadas para as bactérias *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Foram também preparadas 15 misturas contendo 64 µL de OE/ combinação, 40 µL de DMSO e 896 µL de meio BHI, usadas para as bactérias *Listeria monocytogenes* LMG 16779 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212¹¹⁴.

Os inóculos bacterianos foram preparados retirando com o auxílio de uma ansa algumas colónias isoladas (cultivadas no dia anterior) e misturando-as com a solução de cloreto de sódio, de modo a obter uma suspensão com densidade celular de 0,5 McFarland ($1-2 \times 10^8$ unidades formadoras de colónias/mL), medida num densitómetro de McFarland DEN-1 (Biosan, Riga, Letónia)¹¹⁴.

Para cada bactéria, adicionou-se em placas de 96 poços 100 µL das misturas (OE, DMSO e meio de cultura) aos poços da primeira linha e, aos restantes poços, adicionou-se 50 µL do respetivo meio de cultura. Fizeram-se diluições 1:2 seriadas (concentrações dos OE/combinções de 0,25 a 32 µL/mL) e adicionaram-se a todos os poços 30 µL do respetivo meio de cultura, 10 µL de solução indicadora de resazurina (0,1% m/v) e 10 µL do respetivo inóculo. Foram preparados controlos positivos, contendo tetraciclina (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos da América) (0,03 a 3,84 µg/mL), para cada bactéria¹¹⁴.

As placas ficaram a incubar a 37°C durante a noite. No dia seguinte observou-se se ocorreu alteração da cor dos poços de azul para rosa/incolor e o valor da CMI (µL/mL) foi registado para a menor concentração em que não ocorreu alteração da cor do poço. Este ensaio foi repetido 3 vezes independentes¹¹⁴.

A partir deste ensaio, as interações entre os OE foram determinadas calculando os valores da concentração inibitória fracionária (CIF) (16), a partir das quais se calculou o índice de concentração inibitória fracionária (Σ CIF)¹¹⁷.

$$(16) \text{ CIF} = \frac{\text{CMI (mistura)}}{\text{CMI(X)}}$$

Na equação (16), CMI (mistura) representa o valor da concentração mínima inibitória de uma dada combinação e CMI (X) representa o valor da concentração mínima inibitória de um dos OE presentes nessa combinação. A CIF é determinada para cada um dos OE presentes numa combinação, assim nas combinações binárias existem 2 valores, nas ternárias 3 e na quaternária 4. O $\sum \text{CIF}$ corresponde à soma dos valores da CIF para cada combinação. As interações entre OE foram classificadas como: sinergismo, quando $\sum \text{CIF} \leq 0,5$; adição, quando $0,5 < \sum \text{CIF} \leq 1$; indiferença, quando $1 < \sum \text{CIF} \leq 4$; antagonismo, quando $4 < \sum \text{CIF}$.

Capítulo 4- Resultados

4.1 Determinação da composição química dos óleos essenciais

A composição química dos OE foi determinada por CG-EM e CG-DIC.

Para o OE de palmarosa obteve-se o cromatograma (Figura 9), a partir do qual foram identificados 99,61% dos compostos (Tabela 1).

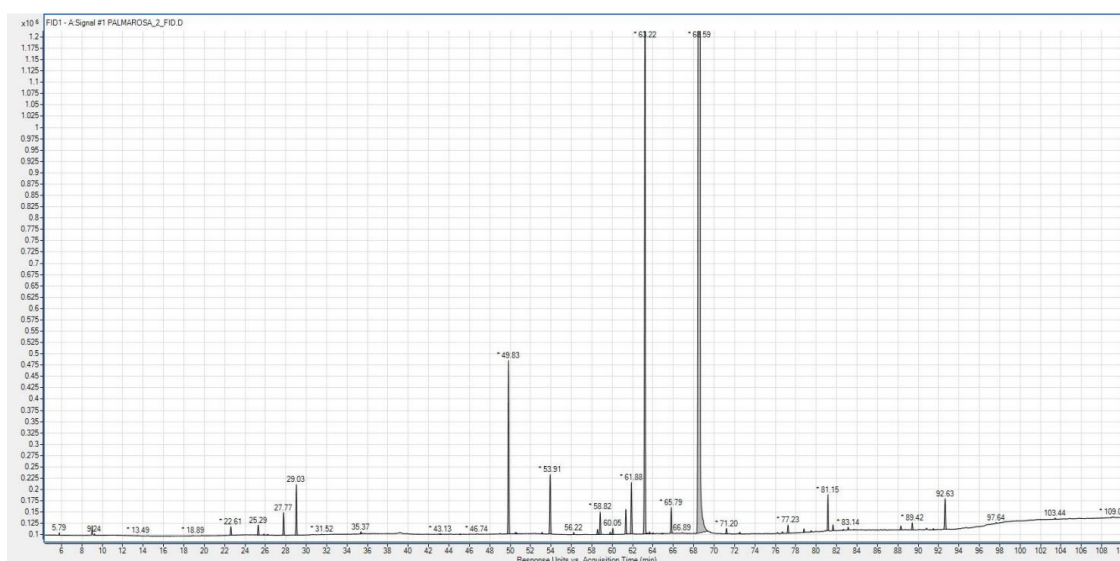


Figura 9- Cromatograma correspondente à análise química do OE de palmarosa.

Tabela 1- Compostos identificados no OE de palmarosa, tempo de retenção (minutos), percentagem (%) relativa e família química.

Tempo de retenção (min.)	Composto	% relativa	Família química
9,24	2-etil-furano	0,01	Furano
13,49	α -pineno	0,01	Monoterpeno
18,89	β -pineno	0,01	Monoterpeno
22,61	β -mirreno	0,12	Monoterpeno
25,29	Limoneno	0,14	Monoterpeno
27,77	<i>cis</i> - β -ocimeno	0,31	Monoterpeno
29,03	<i>trans</i> - β -ocimeno	0,69	Monoterpeno
31,52	α -terpinoleno	0,01	Monoterpeno
35,37	6-metil-5-hepten-2-ona	0,03	Cetona acíclica
43,13	Óxido de <i>cis</i> -linalol (furanóide)	0,01	Álcool monoterpénico

45,10	Óxido de <i>trans</i> -linalol (furanóide)	0,01	Álcool monoterpénico
46,74	Citronelal	0,01	Aldeído monoterpénico
49,83	Linalol	2,31	Álcool monoterpénico
50,53	<i>n</i> -octanol	0,02	Álcool acíclico
53,11	β -elemeno	0,02	Sesquiterpeno
53,91	<i>trans</i> - β -cariofileno	0,94	Sesquiterpeno
58,55	α -humuleno	0,08	Sesquiterpeno
58,82	Neral	0,33	Aldeído monoterpénico
59,80	Isómero de selineno	0,04	Sesquiterpeno
60,05	Formato de geranilo	0,08	Éster monoterpénico
61,34	Valenceno	0,34	Sesquiterpeno
61,88	Geranial	0,73	Aldeído monoterpénico
63,22	Acetato de geranilo	9,45	Éster monoterpénico
63,64	Citronelol	0,03	Álcool monoterpénico
64,92	7-epi- α -selineno	0,01	Sesquiterpeno
65,79	Nerol	0,36	Álcool monoterpénico
68,59	Geraniol	82,04	Álcool monoterpénico
71,20	Butirato de geranilo	0,08	Éster monoterpénico
72,51	Isovalerato de nerilo	0,03	Éster sesquiterpénico
76,68	Óxido de cariofileno (isómero I)	0,02	Éter sesquiterpénico
77,23	Óxido de cariofileno (isómero II)	0,13	Éter sesquiterpénico
78,79	<i>trans</i> -nerolidol	0,05	Álcool sesquiterpénico
81,15	Caproato de geranilo	0,44	Éster sesquiterpénico
83,70	Fitona	0,01	Cetona sesquiterpénica
88,30	(E,E)-acetato de farnesilo	0,06	Éster sesquiterpénico
89,42	Octanoato de geranilo	0,11	Éster sesquiterpénico
92,63	(E,E)-farnesol	0,54	Álcool sesquiterpénico

A partir do cromatograma (Figura 9) foram identificados 37 compostos, dos quais 18,92% são monoterpénos, 16,22% são sesquiterpenos, 32,43% são monoterpénoides e 24,32% são sesquiterpenoides.

Dos terpenoides (56,75%), 4,76% são cetonas, 9,52% são éteres, 14,29% são aldeídos, 33,33% são ésteres e 38,10% são álcoois.

Dos 37 compostos identificados, os maioritários são o geraniol (82,04%) e o acetato de geranilo (9,45%), que tiveram tempos de retenção de 68,59 e 63,22 minutos, respetivamente.

Para o OE de bergamota obteve-se o cromatograma (Figura 10), a partir do qual foram identificados 99,33% dos compostos (Tabela 2).

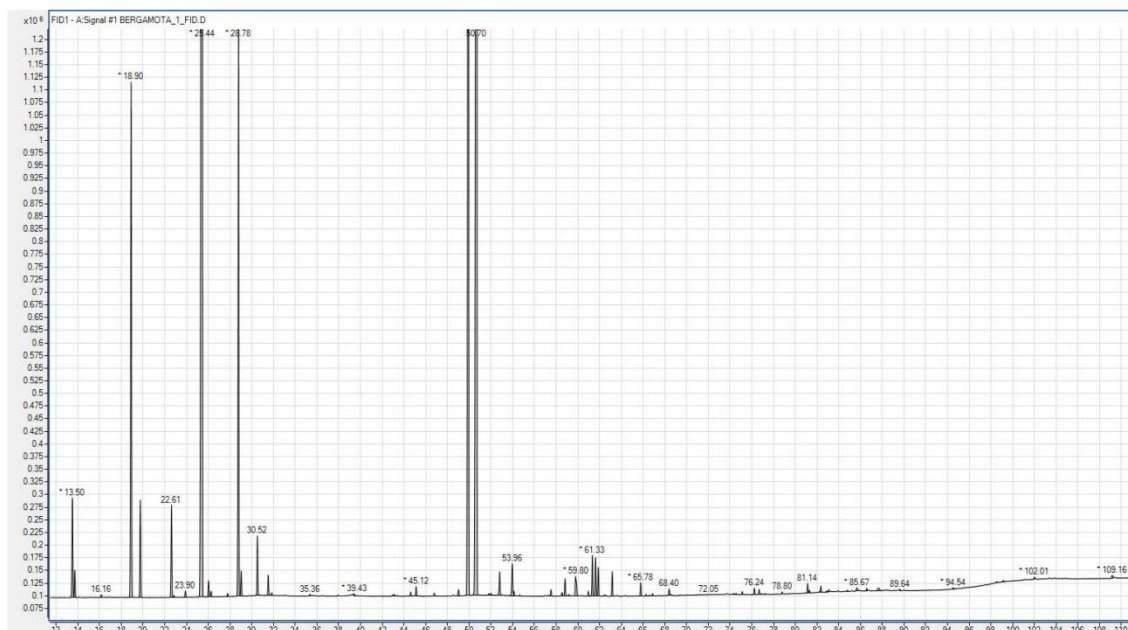


Figura 10- Cromatograma correspondente à análise química do OE de bergamota.

Tabela 2- Compostos identificados no OE de bergamota, tempo de retenção (minutos), percentagem (%) relativa e família química.

Tempo de retenção (min.)	Composto	% relativa	Família química
13,50	α -pineno	1,04	Monoterpeno
13,72	α -tujeno	0,27	Monoterpeno
16,16	Canfeno	0,03	Monoterpeno
18,90	β -pineno	5,68	Monoterpeno
19,74	Sabineno	1,00	Monoterpeno
21,68	Δ -3-careno	0,01	Monoterpeno
22,61	β -mirceno	0,89	Monoterpeno
22,84	α -felandreno	0,02	Monoterpeno
23,16	<i>p</i> -menta-1(7),8-dieno (pseudolimoneno)	0,01	Monoterpeno
23,90	α -terpineno	0,06	Monoterpeno
25,44	Limoneno	33,39	Monoterpeno
26,02	β -felandreno	0,16	Monoterpeno
26,25	1,8-cineol	0,06	Éter monoterpénico
27,78	<i>cis</i> - β -ocimeno	0,03	Monoterpeno
28,78	γ -terpineno	5,87	Monoterpeno
29,03	<i>trans</i> - β -ocimeno	0,24	Monoterpeno
30,52	<i>p</i> -cimeno	0,60	Monoterpeno
31,52	α -terpinoleno	0,20	Monoterpeno
31,84	<i>n</i> -octanal	0,02	Aldeído acíclico
35,36	6-metil-5-hepten-2-ona	0,02	Cetona acíclica

39,43	<i>n</i> -nonanal	0,02	Aldeído acíclico
43,14	Óxido de <i>cis</i> -linalol (furanoide)	0,02	Álcool monoterpénico
43,47	Óxido de limoneno	0,01	Éter monoterpénico
44,62	Hidrato <i>trans</i> -sabineno	0,04	Álcool monoterpénico
45,12	Acetato de octilo	0,10	Éster monoterpénico
46,78	<i>n</i> -decanal	0,03	Aldeído monoterpénico
49,03	Acetato de hidrato <i>cis</i> -sabineno	0,07	Éster monoterpénico
49,92	Linalol	16,59	Álcool monoterpénico
50,70	Acetato de linalilo	29,84	Éster monoterpénico
51,78	<i>cis</i> - α -bergamoteno	0,01	Sesquiterpeno
51,99	Acetato de nonilo	0,02	Éster monoterpénico
52,80	<i>trans</i> - α -bergamoteno	0,26	Sesquiterpeno
53,16	β -elemeno	0,01	Sesquiterpeno
53,80	Aldeído C-11 undecanal	0,01	Aldeído monoterpénico
53,96	<i>trans</i> - β -cariofileno + Terpinen-4-ol	0,36	Sesquiterpeno + Álcool monoterpénico
54,12	Formato de linalilo	0,04	Éster monoterpénico
57,35	Acetato de citronelilo	0,01	Éster monoterpénico
57,52	<i>trans</i> - β -farneseno	0,06	Sesquiterpeno
58,54	Acetato de decilo	0,04	Éster monoterpénico
58,82	Neral	0,18	Aldeído monoterpénico
59,80	α -terpineol + acetato de α -terpinilo	0,31	Álcool monoterpénico + Éster monoterpénico
60,97	Germacreno D	0,05	Sesquiterpeno
61,33	Acetato de nerilo	0,40	Éster monoterpénico
61,63	β -bisaboleno	0,39	Sesquiterpeno
61,87	Geranial	0,29	Aldeído monoterpénico
62,63	(E,E)- α -farneseno	0,01	Sesquiterpeno
63,16	Acetato de geranilo	0,24	Éster monoterpénico
65,78	Nerol	0,13	Álcool monoterpénico
68,40	Geraniol	0,06	Álcool monoterpénico
69,43	Acetato de limonen-10-ilo	0,01	Éster monoterpénico
72,05	Acetato de perililo	0,01	Éster monoterpénico
75,11	<i>n</i> -dodecanol	0,03	Álcool monoterpénico
78,80	<i>trans</i> -nerolidol	0,02	Álcool sesquiterpénico
86,58	α -bisabolol	0,03	Álcool sesquiterpénico
102,01	Nootcatona	0,03	Cetona sesquiterpénica

A partir do cromatograma (Figura 10) foram identificados 57 compostos, dos quais 29,82% são monoterpénos, 14,04% são sesquiterpenos, 45,61% são monoterpénoides e 5,26% são sesquiterpenoides.

Dos terpenoides (50,87%), 3,45% são cetonas, 6,90% são éteres, 13,79% são aldeídos, 34,48% são álcoois e 41,38% são ésteres.

Dos 57 compostos identificados, os maioritários são o limoneno (33,39%), o acetato de linalilo (29,84%), o linalol (16,59%), o γ -terpineno (5,87%) e o β -pineno (5,68%), que tiveram tempos de retenção de 25,44; 50,70; 49,92; 28,78 e 18,9 minutos, respetivamente.

Para o OE de esteva obteve-se o cromatograma (Figura 11), a partir do qual foram identificados 93,17% dos compostos (Tabela 3).

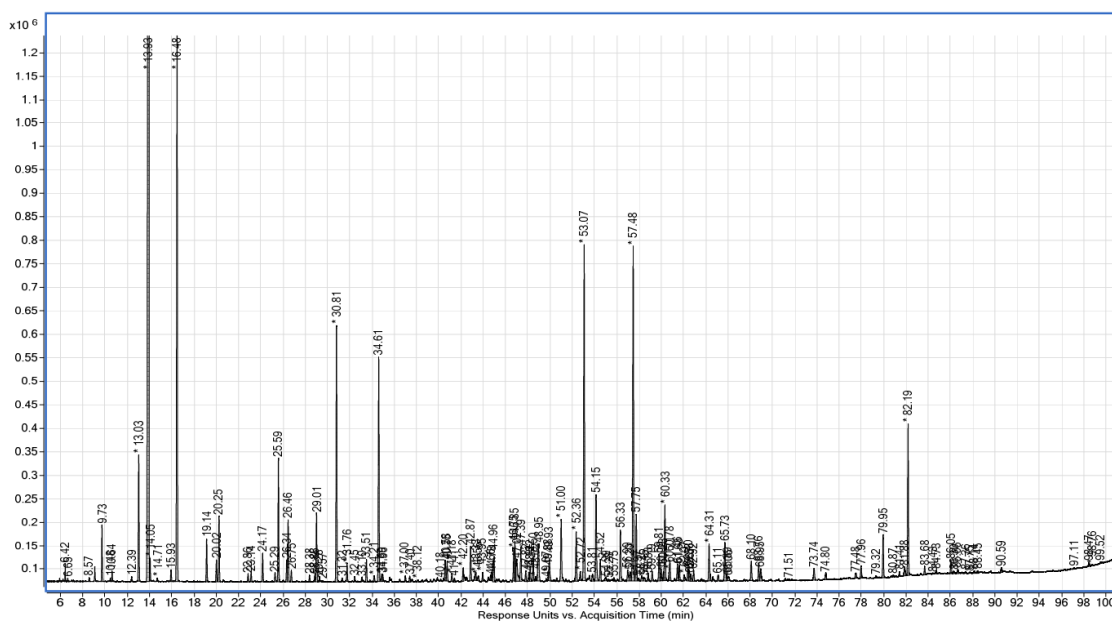


Figura 11- Cromatograma correspondente à análise química do OE de esteva.

Tabela 3- Compostos identificados no OE de esteva, tempo de retenção (minutos), percentagem (%) relativa e família química.

Tempo de retenção (min.)	Composto	% relativa	Família química
6,42	1,2,3-trimeticiclopenteno	0,13	Hidrocarboneto insaturado ramificado
6,65	1,3-dimetilciclohexeno	0,02	Hidrocarboneto insaturado ramificado
9,73	1,2,4,4-tetrametilciclopenteno	0,63	Hidrocarboneto insaturado ramificado
10,64	<i>trans</i> -pinano	0,12	Monoterpeno
13,03	Triciclano	1,56	Monoterpeno
13,93	α -pineno	39,25	Monoterpeno
14,05	α -tujeno	0,24	Monoterpeno
14,71	Tolueno	0,03	Hidrocarboneto aromático
15,93	α -fencheno	0,15	Monoterpeno
16,48	Canfeno	8,22	Monoterpeno
19,14	β -pineno	0,57	Monoterpeno
20,02	Sabineno	0,29	Monoterpeno
20,25	Verbeneno	0,87	Monoterpeno

Otimização de combinações de óleos essenciais para aplicação na indústria alimentar

22,86	β -mirceno	0,11	Monoterpeno
23,14	α -felandreno	0,12	Monoterpeno
24,17	α -terpineno	0,37	Monoterpeno
25,29	Isómero de mentatrieno	0,14	Monoterpeno
25,59	Limoneno	1,61	Monoterpeno
26,34	1,8-cineol	0,29	Éter monoterpénico
26,46	β -felandreno	0,88	Monoterpeno
26,75	<i>p</i> -menta-1,3,8-trieno	0,15	Monoterpeno
28,86	Óxido de dehidroxi- <i>cis</i> -linalol	0,09	Éter monoterpénico
29,01	γ -terpineno	0,92	Monoterpeno
29,28	<i>p</i> -menta-1,5,8-trieno	0,08	Monoterpeno
29,57	Estireno	0,02	Hidrocarboneto aromático
30,81	<i>p</i> -cimeno	3,47	Monoterpeno
31,76	α -terpinoleno	0,25	Monoterpeno
32,45	<i>p</i> -cimenilo	0,07	Monoterpeno
34,61	2,2,6-trimetilciclohexanona	3,20	Cetona cíclica
34,96	Pinol	0,10	Éter monoterpénico
37,00	Óxido de <i>cis</i> -rosa	0,08	Éter monoterpénico
38,12	Óxido de <i>trans</i> -rosa	0,03	Éter monoterpénico
40,58	Cloreto de bornilo	0,34	Monoterpeno halogenado
40,75	Isómero de isoforona	0,28	Cetona cíclica
42,20	α -canfolenal	0,21	Aldeído monoterpénico
42,87	α - <i>p</i> -dimetilestireno	0,51	Monoterpeno
44,66	α -cubebeno	0,07	Sesquiterpeno
44,96	Vitispirano	0,43	Éter monoterpénico
46,75	α -ilangeno	0,48	Sesquiterpeno
47,39	α -copaeno	0,57	Sesquiterpeno
48,22	3-nonen-2-ona	0,22	Cetona acíclica
48,95	Cânfora	0,83	Cetona monoterpénica
49,88	α -gurjuneno	0,05	Sesquiterpeno
49,93	Linalol	0,35	Álcool monoterpénico
51,00	Isopinocanfona	1,04	Cetona monoterpénica
52,36	Pinocarvona	0,77	Cetona monoterpénica
53,07	Acetato de bornilo	5,06	Éster monoterpénico
54,15	Terpinen-4-ol	1,42	Álcool monoterpénico
54,52	<i>trans</i> - β -cariofileno	0,32	Sesquiterpeno
54,99	Aromadendreno	0,08	Sesquiterpeno
55,75	β -ciclocitral	0,06	Aldeído monoterpénico
56,33	Mirtenal	0,83	Aldeído monoterpénico
57,48	<i>trans</i> -pinocarveol	5,48	Álcool monoterpénico
57,75	Alo-aromadendreno	1,10	Sesquiterpeno
57,97	α -felandren-8-ol (I)	0,05	Álcool monoterpénico

58,25	<i>trans</i> -cadin-1(6),4-dieno	0,12	Sesquiterpeno
59,81	Acetato de mirtenilo	0,46	Éster monoterpénico
60,00	α -terpineol	0,19	Álcool monoterpénico
60,23	α -amorfenol	0,11	Sesquiterpeno
60,33	Borneol	1,25	Álcool monoterpénico
60,71	Dehidro-aromadendrano	0,08	Sesquiterpeno
60,78	Ledeno	0,33	Sesquiterpeno
61,46	Verbenona	0,26	Cetona monoterpénica
61,63	β -himachaleno + α -felandren-8-ol (II)	0,25	Sesquiterpeno + álcool monoterpénico
62,53	Acetato de carvilo	0,16	Éster monoterpénico
62,67	Carvona	0,14	Cetona monoterpénica
64,31	Δ -cadineno	0,58	Sesquiterpeno
65,73	Mirtenol	0,71	Álcool monoterpénico
68,10	<i>trans</i> -carveol	0,31	Álcool monoterpénico
68,95	<i>trans</i> -calameneno	0,23	Sesquiterpeno
73,74	α -calacoreno	0,23	Sesquiterpeno
74,80	Palustrol	0,11	Álcool sesquiterpénico
79,95	Ledol	0,64	Álcool sesquiterpénico
80,87	Cubeban-11-ol	0,03	Álcool sesquiterpénico
82,19	Viridiflorol	2,04	Álcool sesquiterpénico
83,68	Espatulenol	0,11	Álcool sesquiterpénico
84,73	Eugenol	0,05	Fenilpropanoide
86,30	Junenol	0,05	Álcool sesquiterpénico
86,66	Ambrox	0,08	Éter sesquiterpénico
88,45	β -eudesmol	0,04	Álcool sesquiterpénico

A partir do cromatograma (Figura 11) foram identificados 81 compostos, dos quais 27,16% são monoterpénos, 18,52% são sesquiterpénos, 33,33% são monoterpénoides, 9,88% são sesquiterpénoides e 1,23% são fenilpropanoides.

Dos terpenoides (43,21%), 2,86% são monoterpénos halogenados, 8,57% são aldeídos, 8,57% são ésteres, 14,29% são cetonas, 20% são éteres e 45,71% são álcoois.

Dos 81 compostos identificados, os maioritários são o α -pineno (39,25%), o canfeno (8,22%), o *trans*-pinocarveol (5,48%) e o acetato de bornilo (5,06%), que tiveram tempos de retenção de 13,93; 16,48; 57,48 e 53,07 minutos, respetivamente.

Para o OE de funcho obteve-se o cromatograma (Figura 12), a partir do qual foram identificados 97,67% dos compostos (Tabela 4).

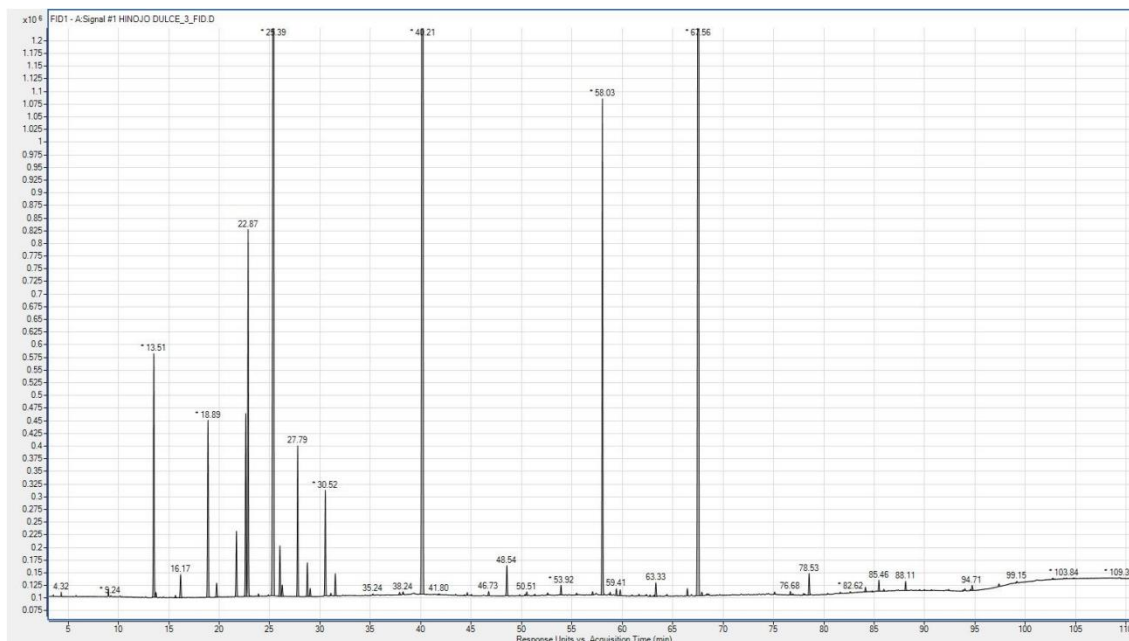


Figura 12- Cromatograma correspondente à análise química do OE de funcho

Tabela 4- Compostos identificados no OE de funcho, tempo de retenção (minutos), percentagem (%) relativa e família química.

Tempo de retenção (min.)	Composto	% relativa	Família química
12,70	Triciclano	0,01	Monoterpeno
13,51	α -pineno	3,05	Monoterpeno
13,72	α -tujeno	0,06	Monoterpeno
15,65	α -fencheno	0,03	Monoterpeno
16,17	Canfeno	0,31	Monoterpeno
18,89	β -pineno	2,31	Monoterpeno
19,74	Sabineno	0,17	Monoterpeno
22,63	β -mirceno	2,02	Monoterpeno
22,87	α -felandreno	4,48	Monoterpeno
23,90	α -terpineno	0,03	Monoterpeno
25,39	Limoneno	21,32	Monoterpeno
26,02	β -felandreno	0,59	Monoterpeno
26,25	1,8-cineol	0,15	Éter monoterpénico
27,79	<i>cis</i> - β -ocimeno	1,70	Monoterpeno
28,74	γ -terpineno	0,39	Monoterpeno
29,03	<i>trans</i> - β -ocimeno	0,09	Monoterpeno
30,52	<i>p</i> -cimeno	1,25	Monoterpeno
31,52	α -terpinoleno	0,26	Monoterpeno
40,21	Fenchona	27,58	Cetona monoterpénica
46,73	α -copaeno	0,06	Sesquiterpeno

48,54	Cânfora	0,39	Cetona monoterpénica
49,81	Linalol	0,01	Álcool monoterpénico
52,59	<i>trans</i> - α -bergamoteno	0,03	Sesquiterpeno
53,92	Terpinen-4-ol	0,11	Álcool monoterpénico
58,03	Estragol	5,90	Fenilpropanoide
60,97	Germacreno D	0,01	Sesquiterpeno
63,33	<i>cis</i> -anetol	0,16	Fenilpropanoide
66,45	<i>cis</i> -sabinol	0,09	Álcool monoterpénico
67,56	<i>trans</i> -anetol	24,81	Fenilpropanoide
78,53	<i>p</i> -anisaldeído	0,25	Aldeído aromático
84,12	Cetona anísica	0,05	Fenilpropanoide

A partir do cromatograma (Figura 12) foram identificados 31 compostos, dos quais 54,84% são monoterpénos, 9,68% são sesquiterpenos, 19,35% são monoterpénoides e 12,90% são fenilpropanoides.

Dos terpenoides (19,35%), 16,67% são éteres, 33,33% são cetonas e 50% são álcoois.

Dos 31 compostos identificados, os maioritários são a fenchona (27,58%), o *trans*-anetol (24,81%), o limoneno (21,32%), e o estragol (5,9%) que tiveram tempos de retenção de 40,21; 67,56; 25,39 e 58,03 minutos, respetivamente.

4.2 Avaliação da atividade antioxidante

Para avaliar a atividade antioxidante dos OE e das respetivas combinações realizou-se o ensaio do sequestro do radical livre DPPH e o ensaio da descoloração do β -caroteno.

Relativamente aos OE, obtiveram-se os valores de percentagem (%) de inibição do radical livre DPPH e da descoloração do β -caroteno (tabela 5), a concentração com capacidade de inibir o radical DPPH e a descoloração do β -caroteno em 50% (CI₅₀) e o índice de atividade antioxidante (IAA), com a respetiva classificação (tabelas 6 e 7).

Tabela 5- Efeito dos OE na percentagem de inibição (%) do radical livre DPPH e da descoloração do β -caroteno. Os valores representam a média \pm desvio-padrão, n=3 e os valores com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Óleos essenciais	%inibição	
	Ensaio do sequestro do radical livre DPPH	Ensaio da descoloração do β -caroteno
Palmarosa	21,27 \pm 2,62 a	29,51 \pm 1,41 e
Bergamota	49,02 \pm 1,30 b	74,49 \pm 1,62 f
Esteva	36,55 \pm 2,10 c	28,71 \pm 0,51 g
Funcho	43,44 \pm 1,51 d	83,19 \pm 3,51 h

O OE com maior percentagem de inibição do radical DPPH foi o de bergamota ($49,02 \pm 1,30$) e o OE com maior percentagem de inibição da descoloração do β -caroteno foi o de funcho ($83,19 \pm 3,51$).

Tabela 6- Propriedades antioxidantes dos OE, avaliadas pelo ensaio do sequestro do radical livre DPPH. Os valores representam a média \pm desvio-padrão, n=3.

Amostras	Palmarosa	Bergamota	Esteva	Funcho	Ácido gálico
CI ₅₀ (%)	$2,01 \pm 0,58$ (v/v)	$0,91 \pm 0,23$ (v/v)	$0,88 \pm 0,28$ (v/v)	$1,55 \pm 0,30$ (v/v)	$0,22 \pm 0,05$ (m/v)
IAA	$2,47 \pm 0,33$	$5,25 \pm 0,60$	$5,51 \pm 0,27$	$3,43 \pm 0,42$	$22,24 \pm 3,68$
Classificação	Muito forte	Muito forte	Muito forte	Muito forte	Muito forte

Relativamente ao ensaio do sequestro do radical livre DPPH, o composto de referência usado foi o ácido gálico, que apresenta atividade antioxidante muito forte ($22,24 \pm 3,68$) e CI₅₀(%) reduzida ($0,22 \pm 0,05$ m/v). Os OE que mais se assemelham ao ácido gálico são os de bergamota e esteva, que apresentaram IAA de, respetivamente, $5,25 \pm 0,60$ e $5,51 \pm 0,27$ e CI₅₀(%) de, respetivamente, $0,91 \pm 0,23$ e $0,88 \pm 0,28$ (v/v).

Tabela 7- Propriedades antioxidantes dos OE, avaliadas pelo ensaio da descoloração do β -caroteno. Os valores representam a média \pm desvio-padrão, n=3.

Amostras	Palmarosa	Bergamota	Esteva	Funcho	BHT
CI ₅₀ (%)	$1,34 \pm 0,06$ (v/v)	$0,69 \pm 0,17$ (v/v)	$0,44 \pm 0,06$ (v/v)	$2,28 \pm 0,06$ (v/v)	$7,70 \pm 0,62$ (m/v)

Relativamente ao ensaio da descoloração do β -caroteno, o composto de referência usado foi o BHT, um antioxidante sintético bastante usado na indústria alimentar, que apresenta CI₅₀(%) de $7,7 \pm 0,62$ (m/v). Todos os OE apresentaram valores reduzidos de CI₅₀(%) e os menores pertenceram aos OE de bergamota ($0,69 \pm 0,17$ v/v) e de esteva ($0,44 \pm 0,06$ v/v).

Para as combinações binárias, ternárias e quaternária dos OE, obtiveram-se os valores para a percentagem (%) de inibição do radical livre DPPH e da descoloração do β -caroteno (Tabela 8).

Tabela 8- Efeito das combinações binárias, ternárias e quaternária de OE na percentagem (%) de inibição do radical livre DPPH e da descoloração do β -caroteno. Os valores representam a média \pm desvio-padrão, n=3. P- palmarosa; B- bergamota; E- esteva; F- funcho.

Combinações	%inibição	
	Ensaio do sequestro do radical livre DPPH	Ensaio da descoloração do β -caroteno
P + B	$39,78 \pm 2,18$	$56,29 \pm 1,54$

P + E	37,16 ± 1,72	36,14 ± 1,12
P + F	12,41 ± 1,63	49,10 ± 0,49
B + E	40,10 ± 1,16	50,22 ± 2,11
B + F	19,95 ± 1,56	71,92 ± 2,29
E + F	16,18 ± 2,92	41,99 ± 1,24
P + B + E	30,14 ± 1,00	60,41 ± 2,32
P + B + F	26,83 ± 0,90	64,90 ± 3,11
P + E + F	31,76 ± 0,81	58,56 ± 5,02
B + E + F	29,53 ± 0,83	76,16 ± 3,58
P + B + E + F	28,17 ± 1,86	63,96 ± 2,14

Relativamente ao ensaio do sequestro do radical livre DPPH, as combinações de OE com maior percentagem de inibição foram as de palmarosa + esteva (37,16 ± 1,72), palmarosa + bergamota (39,78 ± 2,18) e bergamota + esteva (40,10 ± 1,16). Estes resultados fazem sentido dado que os OE de bergamota e de esteva apresentaram elevadas percentagens de inibição, 49,02 ± 1,30 e 36,55 ± 2,10, respetivamente, no entanto o OE de funcho também apresentou um valor elevado (43,44 ± 1,51) e a combinação de palmarosa + funcho apresentou o menor valor de percentagem de inibição (12,41 ± 1,63), revelando antagonismo entre estes dois OE.

Relativamente ao ensaio da descoloração do β -caroteno, as combinações com maior percentagem de inibição foram as de palmarosa + bergamota + funcho (64,90 ± 3,11), bergamota + funcho (71,92 ± 2,29) e bergamota + esteva + funcho (76,16 ± 3,58). A combinação com menor percentagem de inibição foi a de palmarosa + esteva (36,14 ± 1,12). Estes resultados fazem sentido dado que os OE de bergamota e de funcho apresentaram as maiores percentagens de inibição, 74,49 ± 1,62 e 83,19 ± 3,51, respetivamente, e os OE de palmarosa e esteva apresentaram as menores percentagens de inibição, 29,51 ± 1,41 e 28,71 ± 0,51, respetivamente.

Para as combinações binárias, as interações entre OE foram avaliadas através do valor de efeito sinérgico (ES), dos ensaios do sequestro do radical livre DPPH e da descoloração do β -caroteno (Tabela 9).

Tabela 9- Interações entre as combinações binárias de OE, avaliadas pelo ensaio do sequestro do radical livre DPPH e pelo ensaio da descoloração do β -caroteno. Os valores representam a média com 95% IC. P- palmarosa; B- bergamota; E- esteva; F- funcho; IC- intervalo de confiança.

Combinações	Ensaio do sequestro do radical livre DPPH		Ensaio da descoloração do β -caroteno	
	ES (95% IC)	Classificação	ES (95% IC)	Classificação
P + B	0,68 ± 0,43	Antagonismo	0,59 ± 0,05	Antagonismo
P + E	0,70 ± 0,10	Antagonismo	0,75 ± 0,03	Antagonismo
P + F	0,38 ± 0,06	Antagonismo	0,73 ± 0,05	Antagonismo

B + E	0,66 ± 0,03	Antagonismo	0,68 ± 0,06	Antagonismo
B + F	0,60 ± 0,05	Antagonismo	0,77 ± 0,06	Antagonismo
E + F	0,50 ± 0,09	Antagonismo	0,79 ± 0,03	Antagonismo

Todas as combinações binárias de OE resultaram em interações de antagonismo, tanto para o ensaio do sequestro do radical livre DPPH como para o ensaio da descoloração do β -caroteno. Relativamente ao ensaio do sequestro do radical livre DPPH, pode observar-se que o menor valor de ES foi o da combinação palmarosa + funcho (0,38 ± 0,06), sendo este resultado coerente com a sua reduzida percentagem de inibição do radical DPPH (12,41 ± 1,63).

Para as combinações ternárias e quaternária as interações entre OE foram avaliadas através do valor de percentagem (%) de diferença, dos ensaios do sequestro do radical livre DPPH e da descoloração do β -caroteno (Tabela 10).

Tabela 10- Interações entre as combinações ternárias e quaternária de OE, avaliadas pelo ensaio do sequestro do radical livre DPPH e pelo ensaio da descoloração do β -caroteno. P- palmarosa; B- bergamota; E- esteva; F- funcho.

Combinações	Ensaio do sequestro do radical livre DPPH		Ensaio da descoloração do β -caroteno	
	%diferença	Classificação	%diferença	Classificação
P + B + E	-71,79	Antagonismo	-54,48	Antagonismo
P + B + F	-76,41	Antagonismo	-65,33	Antagonismo
P + E + F	-68,64	Antagonismo	-58,59	Antagonismo
B + E + F	-77,11	Antagonismo	-59,14	Antagonismo
P + B + E + F	-81,25	Antagonismo	-70,38	Antagonismo

Todas as combinações ternárias e quaternária de OE resultaram em interações de antagonismo, tanto para o ensaio do sequestro do radical livre DPPH como para o ensaio da descoloração do β -caroteno.

4.3 Avaliação da atividade antimicrobiana

Para avaliar a atividade antimicrobiana realizou-se o ensaio da difusão em disco e para determinar a CMI realizou-se o ensaio da microdiluição utilizando a resazurina como indicador de crescimento.

O primeiro ensaio foi o da difusão em disco e neste obtiveram-se, para cada estirpe bacteriana, os valores do diâmetro (mm) dos halos de inibição causados pelo DMSO, tetraciclina e OE/combinções. Foi possível avaliar as interações entre OE, através da comparação do diâmetro dos halos de inibição das combinações (excluindo o diâmetro

do disco de 6 mm) (DHISD (combinações)) com a soma dos diâmetros dos halos de inibição dos OE (excluindo o diâmetro do disco de 6 mm) usados nessas combinações (Σ DHIOESD). O segundo ensaio foi o da microdiluição utilizando a resazurina como indicador de crescimento, este teve como objetivo determinar, para cada estirpe bacteriana, a CMI dos OE/combinações ($\mu\text{L}/\text{mL}$) e da tetraciclina ($\mu\text{g}/\text{mL}$). Foi possível avaliar as interações entre os OE, através dos valores do índice de concentração inibitória fracionária (Σ CIF) (tabelas 11-16).

Tabela 11- Resultados dos ensaios da difusão em disco, da microdiluição utilizando a resazurina como indicador de crescimento e das interações entre OE para cada ensaio, com a respectiva classificação, para a bactéria *Listeria monocytogenes* LMG 16779. De modo a poder fazer-se o cálculo do Σ CIF para as amostras cuja CMI foi $>32 \mu\text{L}/\text{mL}$, assumiu-se o valor de 32. Os valores dos halos de inibição representam a média \pm desvio-padrão, $n=3$, e os valores da CMI são os valores modais, $n=3$. P- palmarosa; B- bergamota; E- esteva; F- funcho.

Amostra	Diâmetro (mm)	DHISD (mm)	Σ DHIOESD (mm)	Classificação	CMI		Classificação
					($\mu\text{g}/\text{mL}$)/	Σ CIF	
					($\mu\text{L}/\text{mL}$)		
DMSO	6,00 \pm 0,00	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Tetraciclina	18,25 \pm 0,60	-----	-----	-----	0,06	-----	-----
P	24,24 \pm 0,71	18,24 \pm 0,71	-----	-----	16	-----	-----
B	16,82 \pm 1,43	10,82 \pm 1,43	-----	-----	32	-----	-----
E	13,88 \pm 0,60	7,88 \pm 0,60	-----	-----	32	-----	-----
F	9,48 \pm 1,53	3,48 \pm 1,53	-----	-----	>32	-----	-----
P + B	20,00 \pm 2,45	14,00 \pm 2,45	29,06	Antagonismo	16	1,5	Indiferença
P + E	20,22 \pm 0,89	14,22 \pm 0,89	26,11	Antagonismo	16	1,5	Indiferença
P + F	18,45 \pm 2,72	12,45 \pm 2,72	21,72	Antagonismo	16	1,5	Indiferença
B + E	20,21 \pm 2,14	14,21 \pm 2,14	18,70	Antagonismo	16	1	Adição
B + F	14,14 \pm 0,35	8,14 \pm 0,35	14,30	Antagonismo	32	2	Indiferença
E + F	11,05 \pm 1,38	5,05 \pm 1,38	11,36	Antagonismo	>32	2	Indiferença
P + B + E	19,42 \pm 2,67	13,42 \pm 2,67	36,93	Antagonismo	4	0,5	Sinergismo
P + B + F	18,79 \pm 1,15	12,79 \pm 1,15	32,54	Antagonismo	16	2	Indiferença
P + E + F	17,55 \pm 2,78	11,55 \pm 2,78	29,59	Antagonismo	16	2	Indiferença
B + E + F	17,48 \pm 0,45	11,48 \pm 0,45	22,18	Antagonismo	32	3	Indiferença
P + B + E + F	19,73 \pm 0,56	13,73 \pm 0,56	40,41	Antagonismo	16	2,5	Indiferença

Relativamente à bactéria *Listeria monocytogenes* LMG 16779, o DMSO não apresentou atividade antimicrobiana, tendo um halo de inibição correspondente ao diâmetro do disco (6,00 \pm 0,00 mm). A tetraciclina apresentou atividade de 18,25 \pm 0,6 mm e os OE com maior atividade foram o de palmarosa (24,24 \pm 0,71 mm) e o de bergamota (16,82 \pm 1,43 mm), sendo que o primeiro até teve atividade superior à da tetraciclina. Todas as combinações de OE originaram interações de antagonismo. A combinação com maior atividade foi de palmarosa + esteva (20,22 \pm 0,89 mm) e a combinação com menor atividade foi de esteva + funcho (11,05 \pm 1,38 mm), o que faz sentido pois os OE de esteva

e funcho apresentaram as menores atividades antimicrobianas, $13,88 \pm 0,6$ mm e $9,48 \pm 1,53$ mm, respetivamente.

Relativamente à CMI, a tetraciclina apresentou um valor bastante reduzido (0,06 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e a CMI do OE de palmarosa é a que mais se aproxima desse valor (16 $\mu\text{L}/\text{mL}$), sendo, no entanto, bastante mais elevada. As combinações de OE originaram maioritariamente interações de indiferença, destacando-se uma interação de adição, para a combinação de bergamota + esteva (16 $\mu\text{L}/\text{mL}$) e uma interação de sinergismo para a combinação de palmarosa + bergamota + esteva (4 $\mu\text{L}/\text{mL}$), a qual apresentou o menor valor de CMI e também apresentou elevada atividade antimicrobiana ($19,42 \pm 2,67$ mm).

Tabela 12- Resultados dos ensaios da difusão em disco, da microdiluição utilizando a resazurina como indicador de crescimento e das interações entre OE para cada ensaio, com a respetiva classificação, para a bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. De modo a poder fazer-se o cálculo do ΣCIF para as amostras cuja CMI foi >32 $\mu\text{L}/\text{mL}$, assumiu-se o valor de 32. Os valores dos halos de inibição representam a média \pm desvio-padrão, $n=3$, e os valores da CMI são os valores modais, $n=3$. P- palmarosa; B- bergamota; E- esteva; F- funcho.

Amostra	Diâmetro (mm)	DHISD (mm)	$\Sigma\text{DHIOESD}$ (mm)	Classificação	CMI		Classificação
					($\mu\text{g}/\text{mL}$)/	ΣCIF	
					($\mu\text{L}/\text{mL}$)		
DMSO	$6,00 \pm 0,00$	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Tetraciclina	$30,25 \pm 0,50$	-----	-----	-----	0,06	-----	-----
P	$20,70 \pm 1,10$	$14,70 \pm 1,10$	-----	-----	16	-----	-----
B	$16,32 \pm 0,62$	$10,32 \pm 0,62$	-----	-----	16	-----	-----
E	$27,44 \pm 0,94$	$21,44 \pm 0,94$	-----	-----	32	-----	-----
F	$15,09 \pm 2,87$	$9,09 \pm 2,87$	-----	-----	>32	-----	-----
P + B	$19,75 \pm 1,59$	$13,75 \pm 1,59$	25,02	Antagonismo	16	2	Indiferença
P + E	$18,14 \pm 1,38$	$12,14 \pm 1,38$	36,14	Antagonismo	16	1,5	Indiferença
P + F	$16,47 \pm 1,11$	$10,47 \pm 1,11$	23,79	Antagonismo	16	1,5	Indiferença
B + E	$21,85 \pm 1,59$	$15,85 \pm 1,59$	31,76	Antagonismo	16	1,5	Indiferença
B + F	$14,90 \pm 2,50$	$8,90 \pm 2,50$	19,41	Antagonismo	32	3	Indiferença
E + F	$12,54 \pm 0,44$	$6,54 \pm 0,44$	30,53	Antagonismo	32	2	Indiferença
P + B + E	$21,79 \pm 0,90$	$15,79 \pm 0,90$	46,46	Antagonismo	8	1,25	Indiferença
P + B + F	$17,89 \pm 0,23$	$11,89 \pm 0,23$	34,11	Antagonismo	32	5	Antagonismo
P + E + F	$22,15 \pm 1,25$	$16,15 \pm 1,25$	45,23	Antagonismo	16	2	Indiferença
B + E + F	$20,16 \pm 2,78$	$14,16 \pm 2,78$	40,85	Antagonismo	16	2	Indiferença
P + B + E + F	$20,64 \pm 1,33$	$14,64 \pm 1,33$	55,55	Antagonismo	16	2,5	Indiferença

Relativamente à bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, o DMSO não apresentou atividade antimicrobiana, tendo um halo de inibição correspondente ao diâmetro do disco ($6,00 \pm 0,00$ mm) e a tetraciclina apresentou elevada atividade ($30,25 \pm 0,5$ mm). Os OE com maior atividade antimicrobiana foram de palmarosa ($20,70 \pm 1,10$ mm) e de esteva ($27,44 \pm 0,94$ mm), o qual apresenta um valor próximo ao da tetraciclina. Todas

as combinações de OE originaram interações de antagonismo. A combinação com maior atividade foi de palmarosa + esteva + funcho ($22,15 \pm 1,25$ mm) e a combinação com menor atividade foi de esteva + funcho ($12,54 \pm 0,44$ mm), a qual revela o antagonismo entre o OE de esteva, que teve o maior valor de atividade antimicrobiana e o OE de funcho, que teve o menor valor ($15,09 \pm 2,87$ mm).

Relativamente à CMI, a tetraciclina apresentou um valor bastante reduzido ($0,06$ µg/mL) e os OE de palmarosa e de bergamota apresentaram os menores valores (16 µL/mL), sendo, no entanto, bastante superiores ao da tetraciclina. As combinações de OE originaram maioritariamente interações de indiferença, destacando-se uma interação de antagonismo para a combinação de palmarosa + bergamota + funcho (32 µL/mL). A combinação com menor valor de CMI foi de palmarosa + bergamota + esteva (8 µL/mL) e esta também apresentou elevada atividade antimicrobiana ($21,79 \pm 0,90$ mm).

Tabela 13- Resultados dos ensaios da difusão em disco, da microdiluição utilizando a resazurina como indicador de crescimento e das interações entre OE para cada ensaio, com a respetiva classificação, para a bactéria *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. De modo a poder fazer-se o cálculo do Σ CIF para as amostras cuja CMI foi >32 µL/mL, assumiu-se o valor de 32. Os valores dos halos de inibição representam a média \pm desvio-padrão, $n=3$, e os valores da CMI são os valores modais, $n=3$. P- palmarosa; B- bergamota; E- esteva; F- funcho.

Amostra	Diâmetro (mm)	DHISD (mm)	Σ DHIOESD (mm)	Classificação	CMI		
					(µg/mL)/ (µL/mL)	Σ CIF	Classificação
DMSO	$6,00 \pm 0,00$	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Tetraciclina	$30,00 \pm 0,82$	-----	-----	-----	0,06	-----	-----
P	$11,53 \pm 0,92$	$5,53 \pm 0,92$	-----	-----	32	-----	-----
B	$15,25 \pm 1,33$	$9,25 \pm 1,33$	-----	-----	32	-----	-----
E	$9,95 \pm 0,92$	$3,95 \pm 0,92$	-----	-----	>32	-----	-----
F	$7,36 \pm 1,22$	$1,36 \pm 1,22$	-----	-----	>32	-----	-----
P + B	$17,29 \pm 1,45$	$11,29 \pm 1,45$	14,78	Antagonismo	32	2	Indiferença
P + E	$10,66 \pm 0,97$	$4,66 \pm 0,97$	9,48	Antagonismo	32	2	Indiferença
P + F	$10,24 \pm 0,79$	$4,24 \pm 0,79$	6,89	Antagonismo	32	2	Indiferença
B + E	$8,78 \pm 1,39$	$2,78 \pm 1,39$	13,20	Antagonismo	32	2	Indiferença
B + F	$8,96 \pm 0,81$	$2,96 \pm 0,81$	10,61	Antagonismo	32	2	Indiferença
E + F	$8,34 \pm 1,19$	$2,34 \pm 1,19$	5,31	Antagonismo	>32	2	Indiferença
P + B + E	$13,68 \pm 0,93$	$7,68 \pm 0,93$	18,73	Antagonismo	32	3	Indiferença
P + B + F	$13,50 \pm 1,63$	$7,50 \pm 1,63$	16,14	Antagonismo	32	3	Indiferença
P + E + F	$11,49 \pm 0,70$	$5,49 \pm 0,70$	10,84	Antagonismo	32	3	Indiferença
B + E + F	$9,16 \pm 0,49$	$3,16 \pm 0,49$	14,56	Antagonismo	32	3	Indiferença
P + B + E + F	$12,19 \pm 0,81$	$6,19 \pm 0,81$	20,09	Antagonismo	32	4	Indiferença

Relativamente à bactéria *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, o DMSO não apresentou atividade antimicrobiana, tendo um halo de inibição correspondente ao diâmetro do

disco ($6,00 \pm 0,00$ mm) e a tetraciclina apresentou elevada atividade ($30,00 \pm 0,82$ mm). Os OE com maior atividade antimicrobiana foram de palmarosa ($11,53 \pm 0,92$ mm) e de bergamota ($15,25 \pm 1,33$ mm), que tiveram valores reduzidos quando comparados ao da tetraciclina. Todas as combinações de OE originaram interações de antagonismo. A combinação com maior atividade foi de palmarosa + bergamota ($17,29 \pm 1,45$ mm) e a combinação com menor atividade foi de esteva + funcho ($8,34 \pm 1,19$ mm), o que faz sentido dado que os OE de esteva e funcho apresentaram as menores atividades antimicrobianas, $9,95 \pm 0,92$ mm e $7,36 \pm 1,22$ mm, respetivamente.

Relativamente à CMI a tetraciclina apresentou um valor bastante reduzido ($0,06$ µg/mL), contrastando com a CMI dos OE/combinções, para os quais não houve nenhum valor inferior a 32 µL/mL. Todas as combinações de OE originaram interações de indiferença.

Tabela 14- Resultados dos ensaios da difusão em disco, da microdiluição utilizando a resazurina como indicador de crescimento e das interações entre OE para cada ensaio, com a respetiva classificação, para a bactéria *Escherichia coli* ATCC 25922. De modo a poder fazer-se o cálculo do Σ CIF para as amostras cuja CMI foi >32 µL/mL, assumiu-se o valor de 32. Os valores dos halos de inibição representam a média \pm desvio-padrão, $n=3$, e os valores da CMI são os valores modais, $n=3$. P- palmarosa; B- bergamota; E- esteva; F- funcho.

Amostra	Diâmetro (mm)	DHISD (mm)	Σ DHIOESD		CMI		Classificação
			(mm)	Classificação	(µg/mL)/ (µL/mL)	Σ CIF	
DMSO	$6,00 \pm 0,00$	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Tetraciclina	$23,25 \pm 0,50$	-----	-----	-----	0,06	-----	-----
P	$20,43 \pm 1,19$	$14,43 \pm 1,19$	-----	-----	8	-----	-----
B	$12,41 \pm 0,95$	$6,41 \pm 0,95$	-----	-----	8	-----	-----
E	$12,55 \pm 2,21$	$6,55 \pm 2,21$	-----	-----	32	-----	-----
F	$13,65 \pm 0,53$	$7,65 \pm 0,53$	-----	-----	>32	-----	-----
P + B	$18,71 \pm 1,54$	$12,71 \pm 1,54$	20,84	Antagonismo	4	1	Adição
P + E	$18,08 \pm 2,04$	$12,08 \pm 2,04$	20,98	Antagonismo	16	2,5	Indiferença
P + F	$17,62 \pm 2,67$	$11,62 \pm 2,67$	22,08	Antagonismo	16	2,5	Indiferença
B + E	$13,58 \pm 1,80$	$7,58 \pm 1,80$	12,96	Antagonismo	8	1,25	Indiferença
B + F	$12,61 \pm 1,73$	$6,61 \pm 1,73$	14,06	Antagonismo	16	2,5	Indiferença
E + F	$11,71 \pm 0,60$	$5,71 \pm 0,60$	14,20	Antagonismo	16	1	Adição
P + B + E	$17,10 \pm 0,59$	$11,10 \pm 0,59$	27,39	Antagonismo	4	1,125	Indiferença
P + B + F	$18,87 \pm 3,73$	$12,87 \pm 3,73$	28,49	Antagonismo	16	4,5	Antagonismo
P + E + F	$19,74 \pm 1,51$	$13,74 \pm 1,51$	28,63	Antagonismo	16	3	Indiferença
B + E + F	$11,86 \pm 0,42$	$5,86 \pm 0,42$	20,61	Antagonismo	16	3	Indiferença
P + B + E + F	$16,71 \pm 0,28$	$10,71 \pm 0,28$	35,04	Antagonismo	8	2,5	Indiferença

Relativamente à bactéria *Escherichia coli* ATCC 25922, o DMSO não apresentou atividade antimicrobiana, tendo um halo de inibição correspondente ao diâmetro do

disco ($6,00 \pm 0,00$ mm). A tetraciclina apresentou atividade de $23,25 \pm 0,50$ mm e o OE de palmarosa ($20,43 \pm 1,19$ mm), foi o que teve um valor mais aproximado ao da tetraciclina. Os OE de bergamota, esteva e funcho apresentaram valores de atividade antimicrobiana bastante semelhantes entre si, $12,41 \pm 0,95$ mm, $12,55 \pm 2,21$ mm e $13,65 \pm 0,53$ mm, respetivamente. Todas as combinações de OE originaram interações de antagonismo. A combinação com maior atividade foi de palmarosa + esteva + funcho ($19,74 \pm 1,51$ mm) e a combinação com menor atividade foi de bergamota + esteva + funcho ($11,86 \pm 0,42$ mm), a qual corresponde à mistura de OE com as menores atividades antimicrobianas.

Relativamente à CMI, a tetraciclina apresentou um valor bastante reduzido ($0,06$ $\mu\text{g/mL}$) e os OE de palmarosa e de bergamota apresentaram os menores valores (8 $\mu\text{L/mL}$), sendo, no entanto, bastante superiores ao da tetraciclina. As combinações de OE originaram maioritariamente interações de indiferença destacando-se duas interações de adição para as combinações de palmarosa + bergamota (4 $\mu\text{L/mL}$) e de esteva + funcho (16 $\mu\text{L/mL}$) e uma interação de antagonismo para a combinação de palmarosa + bergamota + funcho (16 $\mu\text{L/mL}$). As combinações com menor valor de CMI foram de palmarosa + bergamota (4 $\mu\text{L/mL}$) e de palmarosa + bergamota + esteva (4 $\mu\text{L/mL}$), as quais também apresentaram elevada atividade antimicrobiana, $18,71 \pm 1,54$ mm e $17,10 \pm 0,59$ mm, respetivamente.

Tabela 15- Resultados dos ensaios da difusão em disco, da microdiluição utilizando a resazurina como indicador de crescimento e das interações entre OE para cada ensaio, com a respetiva classificação, para a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. De modo a poder fazer-se o cálculo do ΣCIF para as amostras cuja CMI foi >32 $\mu\text{L/mL}$, assumiu-se o valor de 32. Os valores dos halos de inibição representam a média \pm desvio-padrão, $n=3$, e os valores da CMI são os valores modais, $n=3$. P- palmarosa; B- bergamota; E- esteva; F- funcho.

Amostra	Diâmetro (mm)	DHISD (mm)	$\Sigma\text{DHIOESD}$ (mm)	Classificação	CMI		Classificação
					($\mu\text{g/mL}$)/	ΣCIF	
					($\mu\text{L/mL}$)		
DMSO	$6,00 \pm 0,00$		-----	-----	-----	-----	-----
Tetraciclina	$22,25 \pm 0,50$		-----	-----	0,06	-----	-----
P	$7,73 \pm 0,17$	$1,73 \pm 0,17$	-----	-----	16	-----	-----
B	$6,55 \pm 0,95$	$0,55 \pm 0,95$	-----	-----	32	-----	-----
E	$6,29 \pm 0,50$	$0,29 \pm 0,50$	-----	-----	>32	-----	-----
F	$6,07 \pm 0,13$	$0,07 \pm 0,13$	-----	-----	>32	-----	-----
P + B	$7,69 \pm 0,35$	$1,69 \pm 0,35$	2,28	Antagonismo	16	1,5	Indiferença
P + E	$6,97 \pm 0,39$	$0,97 \pm 0,39$	2,02	Antagonismo	16	1,5	Indiferença
P + F	$6,99 \pm 0,86$	$0,99 \pm 0,86$	1,80	Indiferença	32	3	Indiferença
B + E	$8,46 \pm 0,55$	$2,46 \pm 0,55$	0,84	Sinergismo	32	2	Indiferença
B + F	$6,61 \pm 1,05$	$0,61 \pm 1,05$	0,62	Indiferença	32	2	Indiferença
E + F	$6,40 \pm 0,69$	$0,40 \pm 0,69$	0,36	Indiferença	>32	2	Indiferença
P + B + E	$8,95 \pm 0,27$	$2,95 \pm 0,27$	2,57	Sinergismo	16	2	Indiferença

P + B + F	8,02 ± 0,34	2,02 ± 0,34	2,35	Indiferença	16	2	Indiferença
P + E + F	8,58 ± 0,77	2,58 ± 0,77	2,09	Indiferença	32	4	Indiferença
B + E + F	8,59 ± 0,62	2,59 ± 0,62	0,91	Sinergismo	16	1,5	Indiferença
P + B + E + F	7,87 ± 0,36	1,87 ± 0,36	2,64	Antagonismo	32	5	Antagonismo

Relativamente à bactéria *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, o DMSO não apresentou atividade antimicrobiana, tendo um halo de inibição correspondente ao diâmetro do disco (6,00 ± 0,00 mm) e a tetraciclina apresentou atividade de 22,25 ± 0,5 mm. As atividades antimicrobianas dos OE foram muito reduzidas e o valor mais alto pertenceu ao OE de palmarosa (7,73 ± 0,17 mm). As combinações de OE originaram maioritariamente interações de indiferença, no entanto existiram três interações de antagonismo para as combinações de palmarosa + bergamota (7,69 ± 0,35 mm), de palmarosa + esteva (6,97 ± 0,39 mm) e para a combinação quaternária (7,87 ± 0,36 mm). Também existiram três interações de sinergismo para as combinações de bergamota + esteva (8,46 ± 0,55 mm), de palmarosa + bergamota + esteva (8,95 ± 0,27 mm) e de bergamota + esteva + funcho (8,59 ± 0,62 mm). A combinação com maior atividade foi de palmarosa + bergamota + esteva e a combinação com menor atividade foi de esteva + funcho (6,40 ± 0,69 mm), a qual corresponde à mistura dos OE com menores atividades antimicrobianas, a esteva (6,29 ± 0,50 mm) e o funcho (6,07 ± 0,13 mm).

Relativamente à CMI, a tetraciclina apresentou um valor bastante reduzido (0,06 µg/mL) e o OE de palmarosa apresentou o menor valor (16 µL/mL), sendo, no entanto, bastante superior ao da tetraciclina. As combinações de OE originaram maioritariamente interações de indiferença destacando-se uma interação de antagonismo para a combinação quaternária (32 µL/mL). As combinações com menor valor de CMI foram de palmarosa + bergamota, palmarosa + esteva, palmarosa + bergamota + esteva, palmarosa + bergamota + funcho e bergamota + esteva + funcho (16 µL/mL).

Tabela 16- Resultados dos ensaios da difusão em disco, da microdiluição utilizando a resazurina como indicador de crescimento e das interações entre OE para cada ensaio, com a respetiva classificação, para a bactéria *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311. De modo a poder fazer-se o cálculo do Σ CIF para as amostras cuja CMI foi >32 µL/mL, assumiu-se o valor de 32. Os valores dos halos de inibição representam a média ± desvio-padrão, n=3, e os valores da CMI são os valores modais, n=3. P- palmarosa; B- bergamota; E- esteva; F- funcho.

Amostra	Diâmetro (mm)	DHISD (mm)	Σ DHIOESD (mm)	Classificação	CMI		
					(µg/mL)/	Σ CIF	Classificação
					(µL/mL)		
DMSO	6,00 ± 0,00	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Tetraciclina	11,50 ± 0,58	-----	-----	-----	0,24	-----	-----
P	10,07 ± 0,73	4,07 ± 0,73	-----	-----	16	-----	-----
B	10,77 ± 0,78	4,77 ± 0,78	-----	-----	16	-----	-----
E	9,72 ± 1,68	3,72 ± 1,68	-----	-----	32	-----	-----

F	7,24 ± 0,81	1,24 ± 0,81	-----	-----	>32	-----	-----
P + B	12,14 ± 1,20	6,14 ± 1,20	8,84	Antagonismo	8	1	Adição
P + E	9,12 ± 1,16	3,12 ± 1,16	7,79	Antagonismo	16	1,5	Indiferença
P + F	10,48 ± 0,40	4,48 ± 0,40	5,31	Antagonismo	16	1,5	Indiferença
B + E	11,65 ± 1,56	5,65 ± 1,56	8,49	Antagonismo	16	1,5	Indiferença
B + F	8,73 ± 1,69	2,73 ± 1,69	6,01	Antagonismo	32	3	Indiferença
E + F	8,98 ± 0,28	2,98 ± 0,28	4,96	Antagonismo	32	2	Indiferença
P + B + E	11,28 ± 0,98	5,28 ± 0,98	12,56	Antagonismo	16	2,5	Indiferença
P + B + F	10,50 ± 0,41	4,50 ± 0,41	10,08	Antagonismo	16	2,5	Indiferença
P + E + F	9,81 ± 0,68	3,81 ± 0,68	9,03	Antagonismo	16	2	Indiferença
B + E + F	11,72 ± 0,03	5,72 ± 0,03	9,73	Antagonismo	32	4	Indiferença
P + B + E + F	10,52 ± 0,36	4,52 ± 0,36	13,80	Antagonismo	16	3	Indiferença

Relativamente à bactéria *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311, o DMSO não apresentou atividade antimicrobiana, tendo um halo de inibição correspondente ao diâmetro do disco (6,00 ± 0,00 mm). A tetraciclina apresentou atividade de 11,50 ± 0,58 mm e os OE com maior atividade foram de palmarosa (10,07 ± 0,73 mm) e de bergamota (10,77 ± 0,78 mm) e tiveram valores bastante aproximados ao da tetraciclina. Todas as combinações de OE originaram interações de antagonismo. A combinação com maior atividade foi de palmarosa + bergamota (12,14 ± 1,20 mm), a qual corresponde à mistura de OE com maiores atividades antimicrobianas, e a combinação com menor atividade foi de bergamota + funcho (8,73 ± 1,69 mm), na qual se observa o antagonismo entre o OE de bergamota, que teve a maior atividade antimicrobiana, e o OE de funcho, que teve a menor atividade (7,24 ± 0,81 mm).

Relativamente à CMI, a tetraciclina apresentou um valor bastante reduzido (0,24 µg/mL). Os OE com menor CMI foram de palmarosa e de bergamota (16 µL/mL) e os seus valores são bastante superiores ao da tetraciclina. As combinações dos OE originaram maioritariamente interações de indiferença destacando-se uma interação de adição para a combinação de palmarosa + bergamota (8 µL/mL), a qual apresentou o menor valor de CMI.

Após o ensaio da difusão em disco, foram tiradas fotografias, num microscópio ótico, às placas de Petri, nas quais se podem observar as zonas de inibição, onde não houve crescimento de colónias bacterianas, causadas por cada OE/combinção. (Figuras 13-18).

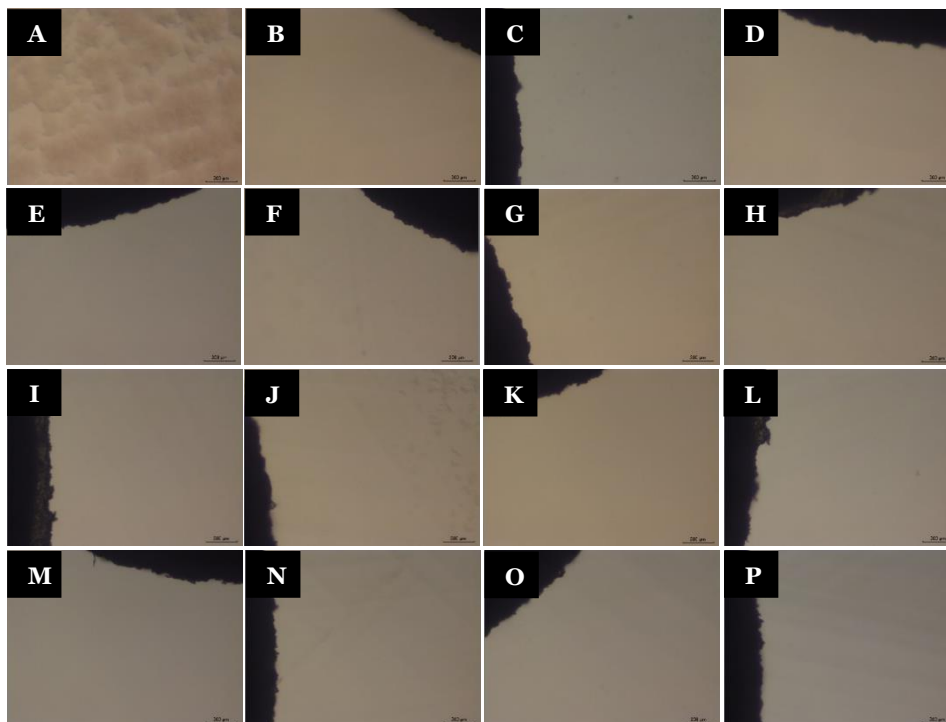


Figura 13- Fotografias tiradas ao microscópio ótico às placas de Petri da bactéria *Listeria monocytogenes* LMG 16779 (ampliação 100×): A- Colónias bacterianas; B- Palmarosa; C- Bergamota; D- Esteva; E- Funcho; F- Palmarosa + bergamota; G- Palmarosa + esteva; H- Palmarosa + funcho; I- Bergamota + esteva; J- Bergamota + funcho; K- Esteva + funcho; L- Palmarosa + bergamota + esteva; M- Palmarosa + bergamota + funcho; N- Palmarosa + esteva + funcho; O- Bergamota + esteva + funcho; P- Palmarosa + bergamota + esteva + funcho.

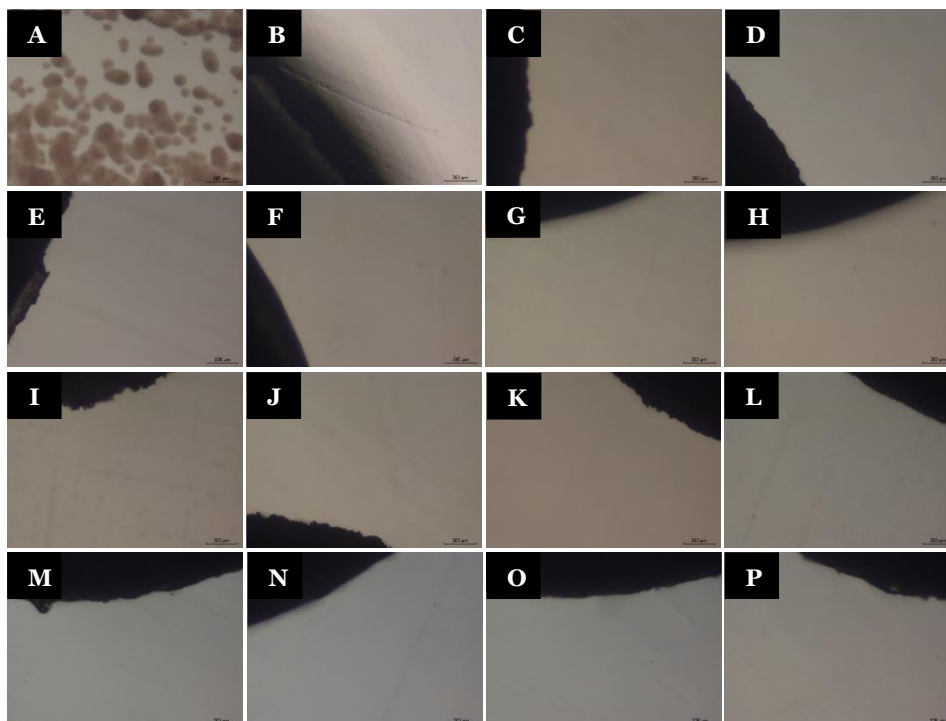


Figura 14- Fotografias tiradas ao microscópio ótico às placas de Petri da bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (ampliação 100×): A- Colónias bacterianas; B- Palmarosa; C- Bergamota; D- Esteva; E- Funcho; F- Palmarosa + bergamota; G- Palmarosa + esteva; H- Palmarosa + funcho; I- Bergamota + esteva; J- Bergamota + funcho; K- Esteva + funcho; L- Palmarosa + bergamota + esteva; M- Palmarosa + bergamota + funcho; N- Palmarosa + esteva + funcho; O- Bergamota + esteva + funcho; P- Palmarosa + bergamota + esteva + funcho.

Relativamente à bactéria *Listeria monocytogenes* LMG 16779, comparando as figuras 13B-P com a figura 13A observa-se que apenas houve crescimento de colónias bacterianas na figura 13J, que corresponde à combinação de bergamota + funcho ($14,14 \pm 0,35$ mm), no entanto este resultado não é coerente com os restantes, dado que os OE de esteva e funcho e a combinação de esteva + funcho apresentaram atividade antimicrobiana inferior, $13,88 \pm 0,60$ mm, $9,48 \pm 1,53$ mm e $11,05 \pm 1,38$ mm, respetivamente, e não foi possível observar crescimento de colónias bacterianas. Assim, a presença de colónias na figura 13J pode dever-se à zona do halo de inibição fotografada. Relativamente à bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, comparando as figuras 14B-P com a figura 14A não foi possível observar crescimento de colónias bacterianas.

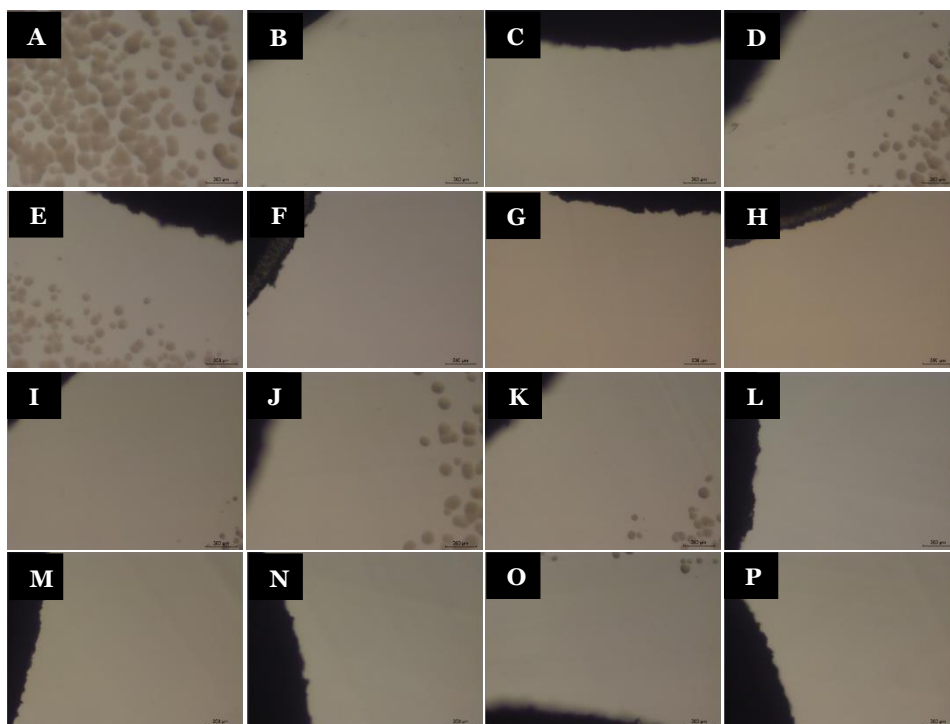


Figura 15- Fotografias tiradas ao microscópio ótico às placas de Petri da bactéria *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (ampliação 100×): A- Colónias bacterianas; B- Palmarosa; C- Bergamota; D- Esteva; E- Funcho; F- Palmarosa + bergamota; G- Palmarosa + esteva; H- Palmarosa + funcho; I- Bergamota + esteva; J- Bergamota + funcho; K- Esteva + funcho; L- Palmarosa + bergamota + esteva; M- Palmarosa + bergamota + funcho; N- Palmarosa + esteva + funcho; O- Bergamota + esteva + funcho; P- Palmarosa + bergamota + esteva + funcho.

Relativamente à bactéria *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, comparando as figuras 15B-P com a figura 15A, foi possível observar crescimento de colónias bacterianas nas figuras 15D, 15E, 15I, 15J, 15K e 15O, correspondentes aos OE de esteva ($9,95 \pm 0,92$ mm) e de funcho ($7,36 \pm 1,22$ mm) e às combinações de bergamota + esteva ($8,78 \pm 1,39$ mm), de bergamota + funcho ($8,96 \pm 0,81$ mm), de esteva + funcho ($8,34 \pm 1,19$ mm) e de bergamota + esteva + funcho ($9,16 \pm 0,49$ mm). Estes resultados fazem sentido pois correspondem aos OE e misturas com menores atividades antimicrobianas.

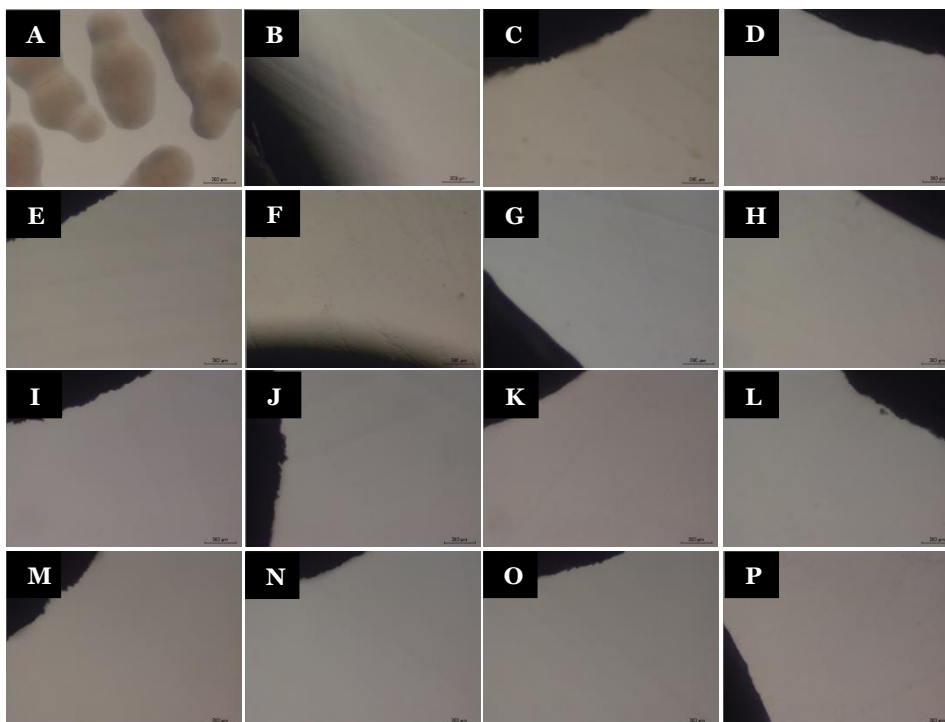


Figura 16- Fotografias tiradas ao microscópio ótico às placas de Petri da bactéria *Escherichia coli* ATCC 25922 (ampliação 100×): A- Colónias bacterianas; B- Palmarosa; C- Bergamota; D- Esteva; E- Funcho; F- Palmarosa + bergamota; G- Palmarosa + esteva; H- Palmarosa + funcho; I- Bergamota + esteva; J- Bergamota + funcho; K- Esteva + funcho; L- Palmarosa + bergamota + esteva; M- Palmarosa + bergamota + funcho; N- Palmarosa + esteva + funcho; O- Bergamota + esteva + funcho; P- Palmarosa + bergamota + esteva + funcho.

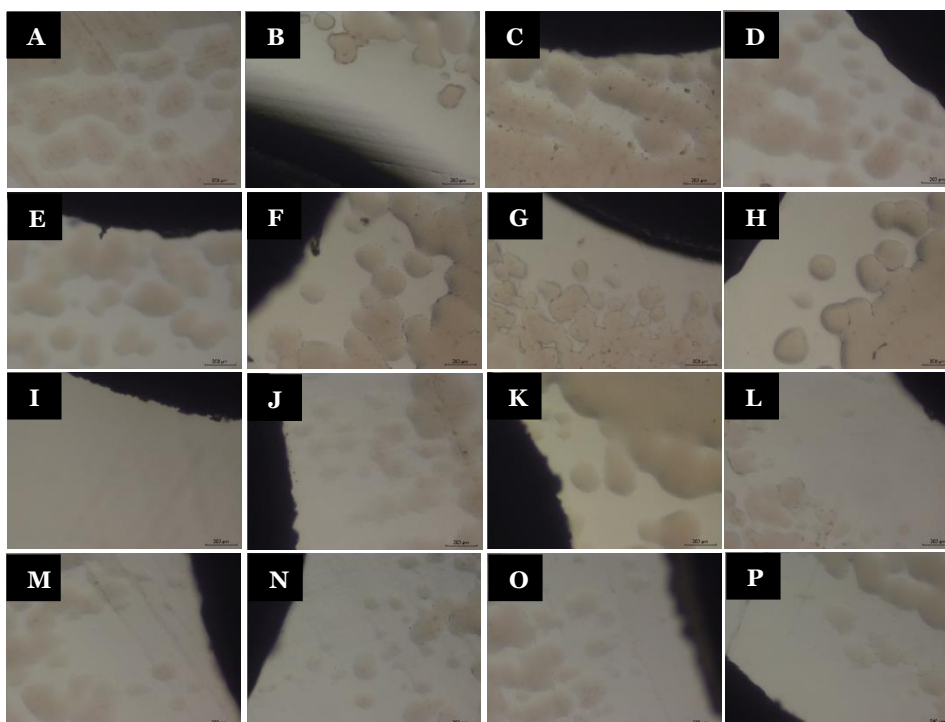


Figura 17- Fotografias tiradas ao microscópio ótico às placas de Petri da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (ampliação 100×): A- Colónias bacterianas; B- Palmarosa; C- Bergamota; D- Esteva; E- Funcho; F- Palmarosa + bergamota; G- Palmarosa + esteva; H- Palmarosa + funcho; I- Bergamota + esteva; J- Bergamota + funcho; K- Esteva + funcho; L- Palmarosa + bergamota + esteva; M- Palmarosa + bergamota + funcho; N- Palmarosa + esteva + funcho; O- Bergamota + esteva + funcho; P- Palmarosa + bergamota + esteva + funcho.

Relativamente à bactéria *Escherichia coli* ATCC 25922, comparando as figuras 16B-P com a figura 16A não foi possível observar crescimento de colónias bacterianas.

Relativamente à bactéria *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, comparando as figuras 17B-P com a figura 17A foi possível observar crescimento de colónias bacterianas em todas as figuras com exceção da figura 17I, correspondente à combinação de bergamota + esteva ($8,46 \pm 0,55$ mm), no entanto este resultado não é coerente com os restantes uma vez que existem combinações com maiores atividades antimicrobianas, correspondentes às figuras 17L, 17N e 17O, palmarosa + bergamota + esteva ($8,95 \pm 0,27$ mm), palmarosa + esteva + funcho ($8,58 \pm 0,77$ mm) e bergamota + esteva + funcho ($8,59 \pm 0,62$ mm), para as quais se observou crescimento de colónias bacterianas. Assim, a ausência de colónias na figura 17I pode dever-se à zona do halo de inibição fotografada.

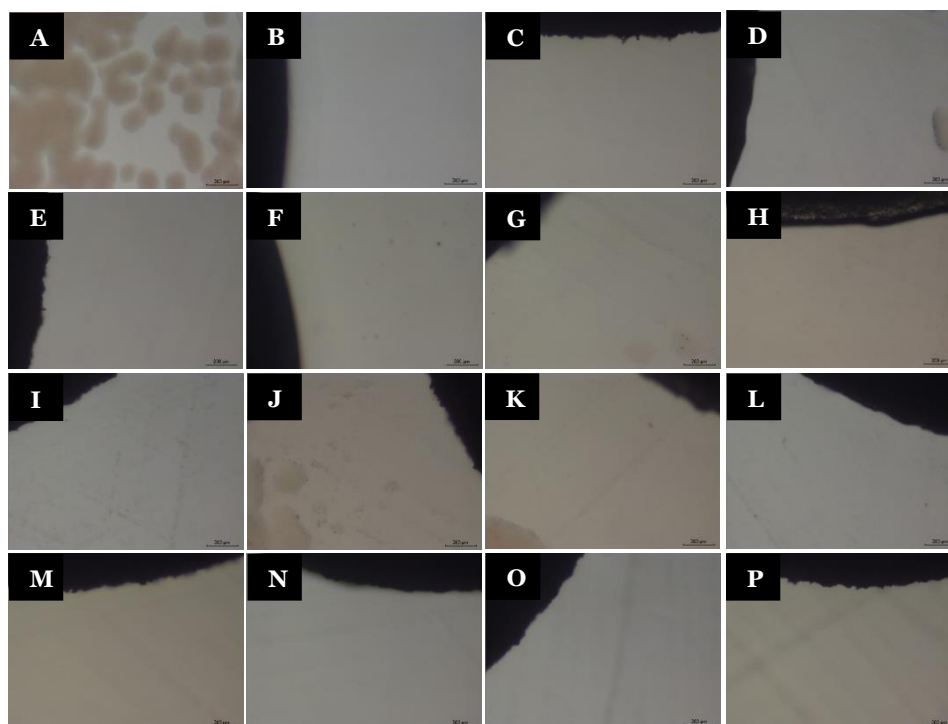


Figura 18- Fotografias tiradas ao microscópio ótico às placas de Petri da bactéria *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 (ampliação 100×): A- Colónias bacterianas; B- Palmarosa; C- Bergamota; D- Esteva; E- Funcho; F- Palmarosa + bergamota; G- Palmarosa + esteva; H- Palmarosa + funcho; I- Bergamota + esteva; J- Bergamota + funcho; K- Esteva + funcho; L- Palmarosa + bergamota + esteva; M- Palmarosa + bergamota + funcho; N- Palmarosa + esteva + funcho; O- Bergamota + esteva + funcho; P- Palmarosa + bergamota + esteva + funcho.

Relativamente à bactéria *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311, comparando as figuras 18B-P com a figura 18A foi possível observar crescimento de colónias bacterianas nas figuras 18D, 18G, 18J e 18K, correspondentes ao OE de esteva ($9,72 \pm 1,68$ mm) e às combinações de palmarosa + esteva ($9,12 \pm 1,16$ mm), de bergamota + funcho ($8,73 \pm 1,69$ mm) e de esteva + funcho ($8,98 \pm 0,28$ mm). No entanto, estes resultados não são

coerentes com os restantes uma vez que o OE de funcho, correspondente à figura 18E, apresentou o menor valor de atividade antimicrobiana ($7,24 \pm 0,81$ mm) e não foi possível observar crescimento bacteriano. Assim, a ausência de colónias na figura 18E pode dever-se à zona do halo de inibição fotografada.

Capítulo 5- Discussão de Resultados

5.1 Composição química dos óleos essenciais

Relativamente à composição química do OE de palmarosa, este apresentou elevado conteúdo de terpenoides (56,75%), dos quais 38,10% são álcoois e 33,33% são ésteres. Os principais compostos identificados foram um álcool monoterpénico, geraniol (82,04%), e um éster monoterpénico, acetato de geraniol (9,45%). No estudo de Devi, M. A. *et al.* (2020), foram identificados como compostos maioritários deste OE, o geraniol (61,41%), o acetato de geraniol (15,89%) e o neral (5,63%), que apenas constituiu 0,33% do nosso OE. Relativamente aos compostos minoritários, o linalol (2,59%) foi identificado numa quantidade semelhante à do nosso OE (2,31%), no entanto houve compostos, como o formato de geraniol (1,04%), o óxido de *cis*-linalol (0,56%) e o caproato de geraniol (2,09%), que foram identificados em quantidades superiores relativamente ao nosso OE (0,08%, 0,01% e 0,44%, respetivamente) e compostos, como o *trans*- β -cariofileno (0,29%), que foram identificados em quantidades inferiores relativamente ao nosso OE (0,94%). Além disso, houve compostos, como o *trans*-verbenol (0,25%), que não foram identificados no nosso estudo e houve compostos, como o geraniol (0,73%), que foram identificados no nosso estudo, mas não foram identificados por estes autores. Neste estudo, o OE de palmarosa também foi extraído das folhas por hidrodestilação, no entanto, estas foram parcialmente secas antes da extração e as plantas foram colhidas na Índia, enquanto o nosso OE foi extraído de plantas colhidas no Nepal. A diferente localização geográfica das plantas e a secagem previamente à extração podem explicar as diferenças nas composições destes OE¹¹⁸.

Relativamente à composição química do OE de bergamota, este apresentou elevado conteúdo de monoterpénos (29,82%) e de terpenoides (50,87%), dos quais 41,38% são ésteres e 34,48% são álcoois. Os principais compostos identificados foram três monoterpénos, limoneno (33,39%), γ -terpineno (5,87%) e β -pineno (5,68%), um éster monoterpénico, acetato de linalol (29,84%) e um álcool monoterpénico, linalol (16,59%). No estudo de Caputo, L. *et al.* (2020) foram identificados como compostos maioritários deste OE, o linalol (33,64%), o limoneno (32,29%), o acetato de linalol (9,22%), o γ -terpineno (6,39%), o α -terpineol (4,62%) e o β -pineno (4,29%). O linalol e o α -terpineol foram identificados em maiores quantidades relativamente ao nosso OE, no qual o α -terpineol representou 0,31% em conjunto com o acetato de α -terpineol. Relativamente aos compostos minoritários, o canfeno (0,02%), o acetato de nonilol

(0,02%) e o germacreno D (0,03%), são exemplos de compostos que foram identificados em quantidades semelhantes às do nosso OE (0,03%, 0,02% e 0,05%, respetivamente). No entanto, houve compostos, como o Δ -3-careno (0,75%), o β -mirceno (1,06%), o acetato de nerilo (0,91%) e o *cis*- α -bergamoteno (0,22%), que foram identificados em quantidades superiores relativamente ao nosso OE (0,01%, 0,89%, 0,40% e 0,01%, respetivamente) e compostos, como o α -pineno (0,62%), o *p*-cimeno (0,13%) e o β -bisaboleno (0,02%), que foram identificados em quantidades inferiores relativamente ao nosso OE (1,04%, 0,60% e 0,39%, respetivamente). Além disso, houve compostos, como o β -tujeno (0,67%) e o butirato de nerilo (1,47%), que não foram identificados no nosso estudo e houve compostos, como o *trans*- α -bergamoteno (0,26%) e o acetato de geranilo (0,24%), que foram identificados no nosso estudo, mas não foram identificados por estes autores. Neste estudo, o OE de bergamota foi extraído da casca do fruto e, apesar deste também ter sido colhido em Itália, o método de extração usado foi a hidrodestilação, enquanto o nosso OE foi extraído por prensagem a frio. Os diferentes métodos de extração usados podem justificar as diferenças nas composições químicas destes OE, principalmente nas quantidades de acetato de linalilo e de linalol, pois as elevadas temperaturas usadas na hidrodestilação promovem a hidrólise de ésteres a álcoois¹¹⁹.

Relativamente à composição química do OE de esteva, este apresentou elevado conteúdo de monoterpenos (27,16%) e de terpenoides (43,21%), dos quais 45,71% são álcoois. Os principais compostos identificados foram dois monoterpenos, α -pineno (39,25%) e canfeno (8,22%), um álcool monoterpénico, *trans*-pinocarveol (5,48%) e um éster monoterpénico, acetato de bornilo (5,06%). No estudo de Pérez-Izquierdo, C. *et al.* (2022) foram identificados como compostos maioritários deste OE, o ledol (18,63%), o α -pineno (14,81%), o viridiflorol (7,11%) e o acetato de bornilo (4,80%). O ledol e o viridiflorol, dois álcoois sesquiterpénicos, foram identificados em quantidades superiores relativamente ao nosso OE (0,64% e 2,04%, respetivamente), o acetato de bornilo foi identificado numa quantidade semelhante, o α -pineno e o canfeno foram identificados em quantidades inferiores (14,81% e 2,23%, respetivamente) e o *trans*-pinocarveol não foi identificado. Relativamente aos compostos minoritários, a 2,2,6-trimetilciclohexanona (2,82%), o α -copaeno, (0,69%), o terpinen-4-ol (1,67%) e o mirtenal (0,94%) são exemplos de compostos que foram identificados em quantidades semelhantes às do nosso OE (3,20%, 0,57%, 1,42% e 0,83%, respetivamente). No entanto, houve compostos, como o ledeno (2,36%) e o espatulenol (1,71%), que foram identificados em quantidades superiores relativamente ao nosso OE (0,33% e 0,11%, respetivamente) e compostos, como o limoneno (0,71%) e o *p*-cimeno (2,24%), que foram identificados em quantidades inferiores relativamente ao nosso OE (1,61% e 3,47%, respetivamente). Além disso, houve compostos, como o ciclossativeno (0,73%) e

o *cis*-calameneno (0,56%), que não foram identificados no nosso estudo e houve compostos, como o acetato de mirtenilo (0,46%) e a pinocarvona (0,77%), que foram identificados no nosso estudo, mas não foram identificados por estes autores. Neste estudo, o OE de esteva foi extraído das partes aéreas de plantas colhidas em Espanha e estas foram secas antes da extração do OE, que foi feita por hidrodestilação. No nosso estudo o OE foi extraído por destilação por arrastamento de vapor das folhas de plantas colhidas em Portugal. Assim, a diferença nas composições químicas destes OE pode dever-se à diferente localização geográfica das plantas, às diferentes partes da planta usadas, à secagem previamente à extração e aos diferentes métodos de extração usados¹²⁰.

Relativamente à composição química do OE de funcho, este apresentou elevado conteúdo de monoterpenos (54,84%) e o seu conteúdo em fenilpropanoides foi superior ao dos restantes OE (12,90%). Os principais compostos identificados foram uma cetona monoterpénica, fenchona (27,58%), um monoterpeneo, limoneno (21,32%), e dois fenilpropanoides, *trans*-anetol (24,81%) e estragol (5,90%). No estudo de Servi, H. *et al.* (2021) foram identificados como compostos maioritários deste OE, o estragol (34,00%), o limoneno (27,10%) e o α -pineno (19,50%), que apresentaram quantidades superiores relativamente ao nosso OE (5,90%, 21,32% e 3,05%, respetivamente). A fenchona foi identificada numa quantidade inferior (2,00%) e o *trans*-anetol não foi identificado. Relativamente aos compostos minoritários, o β -pineno (1,90%), o α -felandreno (3,80%) e o *cis*- β -ocimeno (2,00%) são exemplos de compostos que foram identificados em quantidades semelhantes às do nosso OE (2,31%, 4,48% e 1,70%, respetivamente). No entanto, houve compostos, como o germacreno D (0,50%), que foram identificados em quantidades superiores relativamente ao nosso OE (0,01%). Além disso, houve compostos, como o fenchol (5,10%), que não foram identificados no nosso estudo e houve compostos, como o *p*-anisaldeído (0,25%), que foram identificados no nosso estudo, mas não foram identificados por estes autores. Neste estudo, o OE de funcho foi extraído por hidrodestilação das partes aéreas de plantas colhidas na Turquia, enquanto no nosso estudo o OE foi extraído por destilação por arrastamento de vapor de plantas colhidas em Portugal. Assim, a diferença nas composições químicas destes OE pode dever-se à diferente localização geográfica das plantas e aos diferentes métodos de extração usados¹²¹.

5.2 Atividade antioxidante

O OE de palmarosa apresentou atividade antioxidante muito forte, tendo um IAA de $2,47 \pm 0,33$, e apresentou CI_{50} (%) reduzida tanto para o ensaio do sequestro do radical livre DPPH ($2,01 \pm 0,58$ (v/v)), como para o ensaio da descoloração do β -caroteno ($1,34 \pm 0,06$ (v/v)), no qual apresentou um valor menor que o do composto de referência, BHT ($7,70 \pm 0,62$ (m/v)). A atividade antioxidante demonstrada por este OE também foi reportada no estudo de Tsai, M. *et al.* (2011), no entanto os valores da CI_{50} (%) foram superiores para o ensaio do sequestro do radical livre DPPH ($51,42 \pm 1,25$ μ g/mL) e inferiores para o ensaio da descoloração do β -caroteno ($0,99 \pm 0,03$ μ g/mL), isto pode dever-se a diferenças na composição química do OE, dado que este apresentou uma quantidade superior de acetato de geranilo (12,01%) e inferior de geraniol (52,49%)¹²². Num estudo de Farhath, M. S. S. *et al.* (2013) foi reportado que os compostos geraniol e acetato de geranilo apresentam atividade antioxidante¹²³. Esta atividade pode dever-se à presença de ligações duplas nestes compostos, uma vez que os seus eletrões podem ser transferidos de modo a reduzir os radicais livres, e pode também dever-se à presença do grupo hidroxilo no geraniol, o qual pode doar o seu átomo de hidrogénio aos radicais livres, de modo a neutralizá-los. A atividade antioxidante deste OE pode então ser atribuída aos seus compostos maioritários, no entanto os seus compostos minoritários também podem contribuir, por exemplo no estudo de Wang, C. Y. *et al.* (2019) foi reportada a atividade antioxidante dos compostos linalol, limoneno, α -pineno, nerol e β -mirceno¹²⁴.

O OE de bergamota apresentou atividade antioxidante muito forte, tendo um IAA de $5,25 \pm 0,60$, e apresentou CI_{50} (%) reduzida tanto para o ensaio do sequestro do radical livre DPPH ($0,91 \pm 0,23$ (v/v)), cujo valor foi aproximado ao do composto de referência, ácido gálico ($0,22 \pm 0,05$ (m/v)), como para o ensaio da descoloração do β -caroteno ($0,69 \pm 0,17$ (v/v)), no qual apresentou um valor menor que o do composto de referência, BHT ($7,70 \pm 0,62$ (m/v)). A atividade antioxidante demonstrada por este OE também foi reportada no estudo de Noshad, M. *et al.* (2022), no entanto os valores da CI_{50} (%) foram superiores para o ensaio do sequestro do radical livre DPPH ($212 \pm 2,65$ μ g/mL) e para o ensaio da descoloração do β -caroteno ($89,13 \pm 1,37$ μ g/mL), isto pode dever-se a diferenças na composição química do OE, dado que este apresentou diferentes compostos maioritários: linalol (31,58%), limoneno (21,47%), ácido octadecadienóico (12%), octadecenal (11%) e *trans*- β -ocimeno (6,72%)¹²⁵. Num estudo de Cutillas, A. B. *et al.* (2018) foi reportado que os compostos linalol, acetato de linalilo e γ -terpineno apresentam atividade antioxidante, já nos estudos de Wang, C. Y. *et al.* (2019) e de Wang, W. *et al.* (2008), esta atividade foi reportada para o limoneno e β -pineno, respetivamente^{124,126,127}. Esta atividade pode dever-se à presença de ligações duplas nestes compostos, uma vez que os seus eletrões podem ser transferidos de modo a

reduzir os radicais livres, e pode também dever-se à presença do grupo hidroxilo no linalol, o qual pode doar o seu átomo de hidrogénio aos radicais livres, de modo a neutralizá-los. A atividade antioxidante deste OE pode então ser atribuída aos seus compostos maioritários, no entanto os seus compostos minoritários também podem contribuir, por exemplo nos estudos de Badr, M. M. *et al.* (2021) e de Sharma, S. *et al.* (2019), foi reportada a atividade antioxidante dos compostos canfeno, acetato de α -terpinilo e sabineno, respetivamente^{128,129}.

O OE de esteva apresentou atividade antioxidante muito forte, tendo um IAA de $5,51 \pm 0,27$, e apresentou CI_{50} (%) reduzida tanto para o ensaio do sequestro do radical livre DPPH ($0,88 \pm 0,28$ (v/v)), cujo valor foi aproximado ao do composto de referência, ácido gálico ($0,22 \pm 0,05$ (m/v)), como para o ensaio da descoloração do β -caroteno ($0,44 \pm 0,06$ (v/v)), no qual apresentou um valor menor que o do composto de referência, BHT ($7,70 \pm 0,62$ (m/v)). A atividade antioxidante demonstrada por este OE também foi reportada no estudo de Upadhyay, N. *et al.* (2018), no entanto o valor da CI_{50} (%) para o ensaio do sequestro do radical livre DPPH foi inferior ($7,3 \mu\text{L}/\text{mL}$) e isto pode dever-se a diferenças na composição química do OE, dado que este apresentou diferentes compostos maioritários: α -asarona (78,841%), canfeno (5,575%) e α -pineno (4,258%)¹³⁰. Num estudo de Nicoletti, M. *et al.* (2012) foi reportado que os compostos α -pineno e *trans*-pinocarveol apresentam atividade antioxidante, já os estudos de Badr, M. M. *et al.* (2021) e de Kazemi, M. (2015) reportaram esta atividade para o canfeno e acetato de bornilo, respetivamente^{128,131,132}. Esta atividade pode dever-se à presença de ligações duplas nestes compostos, uma vez que os seus eletrões podem ser transferidos de modo a reduzir os radicais livres, e pode também dever-se à presença do grupo hidroxilo no *trans*-pinocarveol, o qual pode doar o seu átomo de hidrogénio aos radicais livres, de modo a neutralizá-los. A atividade antioxidante deste OE pode então ser atribuída aos seus compostos maioritários, no entanto os seus compostos minoritários também podem contribuir, por exemplo no estudo de Wang, W. *et al.* (2008) foi reportada a atividade antioxidante dos compostos 1,8-cineol e β -pineno¹²⁷.

O OE de funcho apresentou atividade antioxidante muito forte, tendo um IAA de $3,43 \pm 0,42$, e apresentou CI_{50} (%) reduzida tanto para o ensaio do sequestro do radical livre DPPH ($1,55 \pm 0,30$ (v/v)), como para o ensaio da descoloração do β -caroteno ($2,28 \pm 0,06$ (v/v)), no qual apresentou um valor menor que o do composto de referência, BHT ($7,70 \pm 0,62$ (m/v)). No estudo de Khalid, S. *et al.* (2014) foi reportada a atividade antioxidante do OE das folhas de funcho, sendo que o valor da CI_{50} (%) para o ensaio do sequestro do radical livre DPPH ($14,3 \pm 1,8 \mu\text{g}/\text{mL}$) e o valor da percentagem de inibição da descoloração do β -caroteno ($82,4 \pm 2,4\%$) foram semelhantes aos do nosso OE ($1,55 \pm 0,30$ (v/v) e $83,19 \pm 3,51\%$, respetivamente) e isto pode dever-se ao elevado conteúdo

de estragol (30,15%) e de *trans*-anetol (50,60%) deste OE¹³³. Nos estudos de Wang, C. Y. *et al.* (2019), de Júnior, E. B. A. *et al.* (2020), de Singh, S. *et al.* (2020) e de Aazza, S. *et al.* (2011). foi reportada a atividade antioxidante dos compostos limoneno, estragol, fenchona e *trans*-anetol, respetivamente^{124,134–136}. Esta atividade pode dever-se à presença de ligações duplas e de grupos metoxilo no estragol e no *trans*-anetol, uma vez que os seus eletrões podem ser transferidos de modo a reduzir os radicais livres. A atividade antioxidante deste OE pode então ser atribuída aos seus compostos maioritários, no entanto os seus compostos minoritários também podem contribuir, por exemplo no estudo de Scherer, M. M. de C. *et al.* (2019), foi reportada a atividade antioxidante dos compostos α -felandreno e α -terpinoleno¹³⁷.

As interações entre OE foram todas de antagonismo, tanto para o ensaio do sequestro do radical livre DPPH como para o ensaio da descoloração do β -caroteno. Relativamente às combinações envolvendo os OE de palmarosa e de bergamota (P+B, P+B+E, P+B+F, P+B+E+F), as interações de antagonismo podem ser justificadas pelo estabelecimento de pontes de hidrogénio entre os grupos hidroxilo do geraniol e do linalol e os grupos carbonilo do acetato de linalilo e do acetato de geraniol, respetivamente, sendo que isto levará à redução da atividade antioxidante pois os átomos de hidrogénio deixam de estar disponíveis para ser doados aos radicais livres. Relativamente às combinações envolvendo os OE de palmarosa e de esteva (P+E, P+B+E, P+E+F, P+B+E+F), as interações de antagonismo podem ser justificadas pelo estabelecimento de pontes de hidrogénio entre os grupos hidroxilo do geraniol e do *trans*-pinocarveol e os grupos carbonilo do acetato de bornilo e do acetato de geraniol, respetivamente. Relativamente às combinações envolvendo os OE de palmarosa e de funcho (P+F, P+B+F, P+E+F, P+B+E+F), as interações de antagonismo podem ser justificadas pelo estabelecimento de pontes de hidrogénio entre o grupo hidroxilo do geraniol e os grupos carbonilo da fenchona e metoxilo do estragol e do *trans*-anetol, sendo que isto levará à redução da atividade antioxidante pois os átomos de hidrogénio e os eletrões dos grupos metoxilo deixam de estar disponíveis para ser doados aos radicais livres. Relativamente às combinações envolvendo os OE de bergamota e de esteva (B+E, P+B+E, B+E+F, P+B+E+F), as interações de antagonismo podem ser justificadas pelo estabelecimento de pontes de hidrogénio entre os grupos hidroxilo do linalol e do *trans*-pinocarveol e os grupos carbonilo do acetato de bornilo e do acetato de linalilo, respetivamente. Relativamente às combinações envolvendo os OE de bergamota e de funcho (B+F, P+B+F, B+E+F, P+B+E+F), as interações de antagonismo podem ser justificadas pelo estabelecimento de pontes de hidrogénio entre o grupo hidroxilo do linalol e os grupos carbonilo da fenchona e metoxilo do estragol e do *trans*-anetol. Por fim, relativamente às combinações envolvendo os OE de esteva e de funcho (E+F, P+E+F, B+E+F,

P+B+E+F), as interações de antagonismo podem ser justificadas pelo estabelecimento de pontes de hidrogénio entre o grupo hidroxilo do *trans*-pinocarveol e os grupos carbonilo da fenchona e metoxilo do estragol e do *trans*-anetol. Num estudo de Ciesla, L. M. *et al.* (2016), foram avaliadas interações entre compostos relativamente à sua atividade antioxidante e foram observadas interações de antagonismo nas combinações binárias de *p*-cimeno com (S)-(+)-carvona, 1,8-cineol e linalol e nas combinações binárias de 1,8-cineol com (S)-(+)-carvona e linalol. Além disso observaram-se interações de sinergismo na combinação de α -terpineno com *p*-cimeno e nas combinações binárias de α -felandreno com (+)- α -pineno, *p*-cimeno, (S)-(+)-carvona, 1,8-cineol e linalol¹³⁸. Deste estudo pode-se concluir que as interações entre os OE não dependem apenas das interações entre os seus compostos maioritários, mas também das interações dos seus compostos maioritários com os compostos minoritários e das interações entre os seus compostos minoritários. Assim, as interações de antagonismo observadas no nosso estudo também se podem dever a várias interações envolvendo os compostos minoritários dos nossos OE.

5.3 Atividade antimicrobiana

O OE de palmarosa apresentou atividade antimicrobiana para as bactérias *Listeria monocytogenes* LMG 16779 (24,24 \pm 0,71 mm), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (20,70 \pm 1,10 mm), *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (11,53 \pm 0,92 mm), *Escherichia coli* ATCC 25922 (20,43 \pm 1,19 mm), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (7,73 \pm 0,17 mm) e *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 (10,07 \pm 0,73 mm). A sua atividade foi superior à da tetraciclina na bactéria *Listeria monocytogenes* LMG 16779 (18,25 \pm 0,60 mm) e semelhante nas bactérias *Escherichia coli* ATCC 25922 (23,25 \pm 0,50 mm) e *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 (11,50 \pm 0,58 mm). Num estudo de Lodhia, M. H. *et al.* (2009) a atividade antimicrobiana deste OE também foi reportada contra *Escherichia coli* (29,7 mm) e *Staphylococcus aureus* (22,0 mm), no entanto estes valores foram superiores aos do nosso OE e isto pode dever-se a diferenças na composição química deste OE, pois, apesar da sua composição não ter sido referida, este foi extraído por arrastamento de vapor das flores de palmarosa colhida na Índia, sendo provável ter uma composição diferente, além disso estes valores também podem dever-se a diferenças nos métodos usados, dado que estes autores prepararam as suspensões bacterianas com concentrações de 6×10^6 unidades formadoras de colónias/mL¹³⁹.

Relativamente à CMI, os valores obtidos para este OE, 16 μ L/mL (*Listeria monocytogenes* LMG 16779, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas*

aeruginosa ATCC 27853 e *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311), 32 µL/mL (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212) e 8 µL/mL (*Escherichia coli* ATCC 25922), foram superiores aos da tetraciclina 0,06 µg/mL (*Listeria monocytogenes* LMG 16779, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) e 0,24 µg/mL (*Salmonella* Typhimurium ATCC 13311). Num estudo de Tsai, M. *et al.* (2011) os valores da CMI foram determinados para *Escherichia coli* ATCC 25922 (1,54 ± 0,07 µg/mL), *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (1,04 ± 0,07 µg/mL) e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (>20 µg/mL), no entanto o valor para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 foi superior ao do nosso OE e os valores para *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* foram inferiores, isto pode dever-se a diferenças na composição química deste OE, que apresentou uma quantidade inferior de geraniol (52,49%) e superior de acetato de geranilo (12,01%), além disso também se pode dever à diferença nas estirpes de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* usadas e a diferenças nos métodos usados, dado que estes autores utilizaram caldo triptonsoja suplementado com Tween 80 (0,5%) como meio de cultura e as suspensões bacterianas foram preparadas com concentrações de 2×10⁴ unidades formadoras de colónias/mL¹²².

A atividade antimicrobiana deste OE pode ser atribuída aos seus compostos maioritários, por exemplo num estudo de Jirovetz, L. *et al.* (2007), foram reportadas a atividade antimicrobiana do geraniol contra as bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* G 28, *Salmonella* sp. e *Klebsiella pneumoniae* e a atividade antimicrobiana do acetato de geranilo contra as bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella* sp. e *Escherichia coli* ATCC 8739¹⁴⁰. Estas atividades podem dever-se à hidrofobicidade destes compostos, à presença de ligações duplas e à presença do grupo hidroxilo no geraniol. Além disso a atividade antimicrobiana deste OE pode dever-se aos seus compostos minoritários, por exemplo no estudo de Jirovetz, L. *et al.* (2007) foram reportadas as atividades antimicrobianas dos compostos geraniol, formato de geranilo e nerol contra as bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* G 28, *Salmonella* sp. e *Klebsiella pneumoniae*, do butirato de geranilo contra as bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* G 28, *Salmonella* sp. e *Klebsiella pneumoniae* e do isovalerato de nerilo contra as bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Proteus vulgaris*, *Salmonella* sp. e *Klebsiella pneumoniae*¹⁴⁰.

O OE de bergamota apresentou atividade antimicrobiana para as bactérias *Listeria monocytogenes* LMG 16779 (16,82 ± 1,43 mm), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (16,32 ± 0,62 mm), *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (15,25 ± 1,33 mm), *Escherichia coli* ATCC 25922 (12,41 ± 0,95 mm), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (6,55 ± 0,95 mm) e *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 (10,77 ± 0,78 mm). A sua atividade foi semelhante à da tetraciclina nas bactérias *Listeria monocytogenes* LMG 16779 (18,25 ± 0,60 mm) e *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 (11,50 ± 0,58 mm). Esta atividade também foi demonstrada no estudo de Cebi, N. & Erarslan, A. (2023), no qual este OE demonstrou atividade antimicrobiana nas concentrações de 0,5 µg/mL, 1 µg/mL, 2,5 µg/mL e 5 µg/mL contra as bactérias *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 (9,25 ± 0,35 mm; 10,87 ± 1,23 mm; 11,50 ± 0,70 mm e 11,50 ± 0,35 mm, respetivamente), *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (10,00 ± 0,00 mm; 10,50 ± 0,70 mm; 10,50 ± 2,12 mm e 11,50 ± 0,00 mm, respetivamente), *Escherichia coli* ATCC 8739 (10,00 ± 0,00 mm; 11,50 ± 0,70 mm; 12,50 ± 0,70 mm e 12,50 ± 0,00 mm, respetivamente) e *Listeria monocytogenes* ATCC 13932 (10,00 ± 0,00 mm; 12,75 ± 0,35 mm; 13,00 ± 0,70 mm e 13,50 ± 0,70 mm, respetivamente)¹⁴¹.

Relativamente à CMI, os valores obtidos para este OE, 32 µL/mL (*Listeria monocytogenes* LMG 16779, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853), 8 µL/mL (*Escherichia coli* ATCC 25922) e 16 µL/mL (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311), foram superiores aos da tetraciclina 0,06 µg/mL (*Listeria monocytogenes* LMG 16779, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) e 0,24 µg/mL (*Salmonella* Typhimurium ATCC 13311). Num estudo de Lv, F. *et al.* (2011) os valores da CMI foram determinados para as bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (1,25 µL/mL) e *Escherichia coli* ATCC 8739 (5 µL/mL), no entanto estes foram inferiores aos do nosso OE e isto pode dever-se a diferenças na composição química deste OE, que, além de apresentar um composto maioritário que não foi identificado no nosso OE, etanona,1-(1,3-dimetil-3-ciclohexen-1-il) (5,69%), apresentou quantidades inferiores de acetato de linalilo (16,10%), linalol (14,02%), D-limoneno (13,76%), γ-terpineno (4,49%) e β-pineno (não quantificado), além disso estes valores também podem dever-se a diferenças no método usado, dado que estes autores utilizaram caldo nutriente como meio de cultura e prepararam as diluições 1:2 seriadas em tubos¹⁴².

A atividade antimicrobiana deste OE pode ser atribuída aos seus compostos maioritários, por exemplo no estudo de Cristani, M. *et al.* (2007) foi reportada a atividade antimicrobiana do γ-terpineno contra as bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P e *Escherichia coli* ATCC 15221, já no estudo de Soković, M. *et al.* (2010) foram reportadas

a atividade antimicrobiana do linalol contra *Bacillus subtilis* ATCC 10707, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* ATCC 0157:H7, *Micrococcus flavus* ATCC 9341, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Listeria monocytogenes* e a atividade antimicrobiana do limoneno, acetato de linalilo e β -pineno contra *Bacillus subtilis* ATCC 10707, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* ATCC 0157:H7, *Micrococcus flavus* ATCC 9341, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Listeria monocytogenes*^{143,144}. Estas atividades podem dever-se à hidrofobicidade destes compostos, à presença de ligações duplas e à presença do grupo hidroxilo no linalol. Além disso a atividade antimicrobiana deste OE pode dever-se aos seus compostos minoritários, por exemplo no estudo Wang, C. Y. *et al.* (2019) foram reportadas as atividades antimicrobianas dos compostos α -pineno, α -terpineol, β -mirceno, geraniol e nerol contra as bactérias *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* e *Staphylococcus aureus*¹²⁴.

O OE de esteva apresentou atividade antimicrobiana para as bactérias *Listeria monocytogenes* LMG 16779 (13,88 \pm 0,60 mm), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (27,44 \pm 0,94 mm), *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (9,95 \pm 0,92 mm), *Escherichia coli* ATCC 25922 (12,55 \pm 2,21 mm), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (6,29 \pm 0,50 mm) e *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 (9,72 \pm 1,68 mm). A sua atividade foi semelhante à da tetraciclina na bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (30,25 \pm 0,50 mm). No estudo de Karkouri, J. El *et al.* (2021) este OE demonstrou atividade antimicrobiana contra as bactérias *Staphylococcus aureus* (55,00 \pm 0,22 mm), *Escherichia coli* (42,00 \pm 0,11 mm) e *Salmonella* Typhimurium (30,00 \pm 0,25 mm), no entanto estes valores foram superiores aos do nosso OE e isto pode dever-se a diferenças na composição química deste OE, que, além de apresentar diferentes compostos maioritários, viridiflorol (17,74%), ledol (8,85%) e *p*-cimeno (6,11%), apresentou quantidades superiores de *trans*-pinocarveol (11,02%) e de acetato de bornilo (9,38%), inferiores de α -pineno (2,43%) e não apresentou canfeno, além disso estes valores também podem dever-se a diferenças nos métodos usados, dado que neste estudo os discos foram impregnados com 5 μ L de OE⁹⁰.

Relativamente à CMI, os valores obtidos para este OE, 32 μ L/mL (*Listeria monocytogenes* LMG 16779, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311) e >32 μ L/mL (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853), foram superiores aos da tetraciclina 0,06 μ g/mL (*Listeria monocytogenes* LMG 16779, *Staphylococcus aureus*

ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) e 0,24 µg/mL (*Salmonella* Typhimurium ATCC 13311). Num estudo de Karkouri, J. El *et al.* (2021) os valores da CMI foram determinados para as bactérias *Staphylococcus aureus* (10 µL/mL), *Escherichia coli* (10 µL/mL) e *Salmonella* Typhimurium (10 µL/mL), no entanto estes valores foram inferiores aos do nosso OE e isto pode dever-se a diferenças na composição química deste OE, que, além de apresentar diferentes compostos maioritários, viridiflorol (17,74%), ledol (8,85%) e *p*-cimeno (6,11%), apresentou quantidades superiores de *trans*-pinocarveol (11,02%) e acetato de bornilo (9,38%), inferiores de α -pineno (2,43%) e não apresentou canfeno, além disso estes valores também podem dever-se a diferenças nos métodos usados, dado que estes autores prepararam as diluições 1:2 seriadas em tubos e as suspensões bacterianas foram preparadas com concentrações de 10⁵ unidades formadoras de colónias/mL⁹⁰.

A atividade antimicrobiana deste OE pode ser atribuída aos seus compostos maioritários, por exemplo no estudo de Soković, M. *et al.* (2010) foi reportada a atividade antimicrobiana do α -pineno contra *Bacillus subtilis* ATCC 10707, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* ATCC 0157:H7, *Micrococcus flavus* ATCC 9341, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Listeria monocytogenes*¹⁴⁴. No estudo de Runyoro, D. *et al.* (2010) foi reportada a atividade antimicrobiana do acetato de bornilo contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 227853¹⁴⁵. Nos estudos de Badr, M. M. *al.* (2021) e Paraschos, S. *et al.* (2011) foram reportadas a atividade antimicrobiana do canfeno contra *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Salmonella* Typhimurium ATCC1402 e a atividade antimicrobiana do *trans*-pinocarveol contra *Staphylococcus aureus* NCTC 6571, respetivamente^{128,146}. Estas atividades podem dever-se à hidrofobicidade destes compostos, à presença de ligações duplas e à presença do grupo hidroxilo no *trans*-pinocarveol. Além disso a atividade antimicrobiana deste OE pode dever-se aos seus compostos minoritários, por exemplo no estudo Santoyo, S. *et al.* (2005) foram reportadas as atividades antimicrobianas dos compostos verbenona, cânfora, borneol e 1,8-cineol contra os microrganismos *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Escherichia coli* ATCC 11775, *Candida albicans* ATCC 60193 e *Aspergillus niger* ATCC 16404¹⁴⁷.

O OE de funcho apresentou atividade antimicrobiana para as bactérias *Listeria monocytogenes* LMG 16779 (9,48 ± 1,53 mm), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (15,09 ± 2,87 mm), *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (7,36 ± 1,22 mm), *Escherichia*

coli ATCC 25922 ($13,65 \pm 0,53$ mm) e *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 ($7,24 \pm 0,81$ mm) e não apresentou atividade antimicrobiana para a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ($6,07 \pm 0,13$ mm). Este foi o OE com pior atividade antimicrobiana apresentando para todas as bactérias valores muito inferiores aos da tetraciclina (*Listeria monocytogenes* LMG 16779 ($18,25 \pm 0,60$ mm), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ($30,25 \pm 0,50$ mm), *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 ($30,00 \pm 0,82$ mm), *Escherichia coli* ATCC 25922 ($23,25 \pm 0,50$ mm) e *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 ($11,50 \pm 0,58$ mm)). No estudo de Vieira, M. *et al.* (2017) o OE das folhas de funcho apresentou atividade antimicrobiana contra as bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (16 mm) e *Escherichia coli* ATCC 25922 (18 mm) e, tal como observado no nosso estudo, não apresentou atividade antimicrobiana contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Para as bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25922, os valores foram inferiores aos do nosso OE e isto pode dever-se a diferenças na composição química deste OE, que, além de apresentar o β -mirceno (24%) como um dos compostos maioritários, apresentou quantidades inferiores de fenchona (20,4%) e de limoneno (8,6%) e quantidades superiores de *trans*-anetol (32,1%) e de estragol (7,1%)⁶⁸.

Relativamente à CMI, o valor obtido para este OE foi >32 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para todas as bactérias, sendo bastante superior aos valores da tetraciclina $0,06$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ (*Listeria monocytogenes* LMG 16779, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) e $0,24$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ (*Salmonella* Typhimurium ATCC 13311). Num estudo de Vieira, M. *et al.* (2017) os valores da CMI foram determinados para as bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (20 mg/mL), *Escherichia coli* ATCC 25922 (15 mg/mL) e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (20 mg/mL) e, tal como observado para o nosso OE, estes foram bastante elevados⁶⁸.

A atividade antimicrobiana deste OE pode ser atribuída aos seus compostos maioritários, por exemplo num estudo de Friedman, M. *et al.* (2002) foram reportadas as atividades antimicrobianas do limoneno contra *Campylobacter jejuni* RM1221 e *Listeria monocytogenes* RM2388, do estragol contra *Escherichia coli* RM1484, *Salmonella enterica* RM1309, *Campylobacter jejuni* RM1221, *Listeria monocytogenes* RM2199 e *Listeria monocytogenes* RM2388 e do *trans*-anetol contra *Campylobacter jejuni* RM1221¹⁴⁸. Já no estudo de Ahmad, W. *et al.* (2022), foi reportada a atividade antimicrobiana da fenchona contra *Escherichia coli*, *Candida albicans* e contra uma estirpe multirresistente de *Pseudomonas aeruginosa*¹⁴⁹. Estas atividades podem dever-se à hidrofobicidade destes compostos e à presença de ligações duplas, sendo que a ausência de grupos hidroxilo nos compostos maioritários pode justificar a menor

atividade antimicrobiana demonstrada por este OE. Além disso a atividade antimicrobiana deste OE pode dever-se aos seus compostos minoritários, por exemplo no estudo de Friedman, M. *et al.* (2002) foram reportadas as atividades antimicrobianas do linalol contra *Escherichia coli* RM1484, *Salmonella enterica* RM1309 e *Campylobacter jejuni* RM1221 e do 1,8-cineol, contra *Campylobacter jejuni* RM1221¹⁴⁸. As bactérias *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 foram as mais resistentes à ação antimicrobiana dos OE/combinções e isto faz sentido, pois são bactérias Gram-negativas, sendo que estas apresentam membrana externa e possuem hidrolases, no espaço periplasmático, que ajudam a degradar os compostos ativos dos OE. As bactérias Gram-positivas são mais suscetíveis, pois a ausência de membrana externa permite aos compostos dos OE interagir com as moléculas hidrofóbicas que se encontram ligadas ao peptidoglicano, destruir a sua estrutura e inibir a sua síntese, o que leva à alteração da morfologia e à morte celular e isto é coerente com a maior atividade antimicrobiana apresentada pelos OE/combinções para as bactérias *Listeria monocytogenes* LMG 16779 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, que são Gram-positivas^{7,150}. Adicionalmente Vieira, M. *et al.* (2017), conjecturaram que a menor suscetibilidade da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 se pode dever ao estabelecimento de relações de comensalismo entre esta bactéria e a maioria das plantas, levando à sua adaptação aos OE destas plantas⁶⁸.

A maioria das interações observadas entre os OE foram de antagonismo e estas podem dever-se à presença de compostos maioritários com mecanismos de ação semelhantes, que competem pelos recetores das bactérias. Além disso, estas poderão estar relacionadas com as pontes de hidrogénio que se podem formar entre os grupos hidroxilo (presentes nos compostos geraniol, linalol e *trans*-pinocarveol) e os grupos carbonilo (presentes nos compostos acetato de linalilo acetato de geraniol, acetato de bornilo e fenchona) e metoxilo (presentes nos compostos estragol e *trans*-anetol), pois estas podem estar a impedir os compostos de se ligarem aos recetores e de exercer os seus mecanismos de ação. Num estudo de Ntalli, N. G. *et al.* (2011) foram avaliadas interações entre vários compostos relativamente à sua atividade contra *Meloidogyne incognita* e foram observadas interações de sinergismo nas combinações binárias de geraniol com estragol, *trans*-anetol e eugenol. Além disso, foram observadas interações de adição entre o geraniol e a L-carvona, interações de sinergismo entre a L-carvona e o *trans*-anetol e interações de antagonismo nas combinações binárias de L-carvona com estragol e eugenol¹⁵¹. Num outro estudo, de Salinas, C. *et al.* (2022), foram observadas interações de adição entre o (-)-*trans*-cariofileno e o linalol e interações de indiferença nas combinações binárias de linalol com (S)-(-)-limoneno e (R)-(+)-limoneno, na atividade

antimicrobiana contra as estirpes ST5-t311 e ATCC 25923 de *Staphylococcus aureus*¹⁵². Adicionalmente, no estudo de Tserennadmid, R. *et al.* (2011) foram observadas interações de adição nas combinações binárias de linalol com α -pineno e terpinen-4-ol, uma interação de indiferença entre o α -pineno e o terpinen-4-ol e uma interação de sinergismo entre o α -pineno e o limoneno, na atividade antimicrobiana contra *Saccharomyces cerevisiae* MB-21¹⁵³. Destes estudos pode-se concluir que as interações entre os OE não dependem apenas das interações entre os seus compostos maioritários, mas também das interações dos seus compostos maioritários com os compostos minoritários e das interações entre os seus compostos minoritários. Assim, as interações de antagonismo observadas no nosso estudo também se podem dever a várias interações envolvendo os compostos minoritários dos nossos OE.

Para a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 observaram-se interações de sinergismo nas combinações dos OE de bergamota e esteva, de palmarosa, bergamota e esteva e de bergamota, esteva e funcho. Isto, associado às interações de antagonismo observadas para as combinações dos OE de palmarosa e bergamota, de palmarosa e esteva e para a combinação quaternária, sugere que, quando em conjunto, os OE de bergamota e de esteva potenciam a ação dos OE de palmarosa e de funcho na bactéria *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Adicionalmente, na bactéria *Listeria monocytogenes* LMG 16779 observou-se uma interação de sinergismo, ao nível da CMI, para a combinação dos OE de palmarosa, bergamota e esteva o que, mais uma vez, sugere que a combinação dos OE de bergamota e esteva potencia a ação do OE de palmarosa. Uma possível justificação para as interações de sinergismo observadas é os compostos maioritários mais apolares dos OE de bergamota (β -pineno, limoneno e γ -terpineno) e de esteva (α -pineno e canfeno) estarem a interagir com a membrana destas bactérias, aumentando a sua permeabilidade, o que não só permite uma maior ação dos seus compostos mais ativos (linalol e *trans*-pinocarveol), como permite uma maior ação dos compostos dos OE de palmarosa (geraniol e acetato de geranilo) e de funcho (fenchona, estragol e *trans*-anetol).

Capítulo 6- Conclusão e Perspetivas Futuras

Devido à atual demanda dos consumidores por alimentos saudáveis, com maiores tempos de prateleira e livres de conservantes artificiais, vários estudos estão a ser desenvolvidos em busca de novos conservantes naturais. Os OE têm sido vastamente investigados, por serem constituídos por vários compostos bioativos, no entanto, geralmente são necessárias grandes concentrações para obter as atividades biológicas desejadas, o que pode contribuir para a alteração das propriedades organolépticas dos alimentos. Uma maneira de resolver este problema é o desenvolvimento de combinações de OE que apresentem interações de sinergismo. Assim, esta dissertação teve como objetivo avaliar as interações entre os OE *Cymbopogon martinii*, *Citrus aurantium* ssp. *bergamia*, *Cistus ladanifer* e *Foeniculum vulgare*, que são conhecidos pelas suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas.

De modo a avaliar a atividade antioxidante e antimicrobiana foram efetuados o ensaio do sequestro do radical livre DPPH, o ensaio da descoloração do β -caroteno, o ensaio da difusão em disco e o ensaio da microdiluição utilizando a resazurina como indicador de crescimento. A maioria das interações resultantes foram de antagonismo e apenas se observaram interações de sinergismo ao nível da atividade antimicrobiana. As interações de sinergismo ocorreram nas combinações de OE de bergamota e esteva, de palmarosa, bergamota e esteva e de bergamota, esteva e funcho, relativamente ao ensaio da difusão em disco para a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, e na combinação dos OE de palmarosa, bergamota e esteva, relativamente ao ensaio da microdiluição utilizando a resazurina como indicador de crescimento para a bactéria *Listeria monocytogenes* LMG 16779. Estas interações sugerem que a combinação dos OE de bergamota e esteva potencia a ação dos OE de palmarosa e de funcho na bactéria *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e a ação do OE de palmarosa na bactéria *Listeria monocytogenes* LMG 16779.

De modo a tentar alterar as interações de antagonismo para sinergismo, seria pertinente desenvolver novas combinações destes OE com diferentes proporções de cada um deles. Adicionalmente, seria interessante estudar qual o mecanismo e quais os compostos envolvidos nas interações de sinergismo observadas, para posteriormente se avaliarem as interações de combinações de um OE com o composto bioativo de outro OE.

Capítulo 7- Referências Bibliográficas

1. Leichtweis, M. G., Oliveira, M. B. P. P., Ferreira, I. C. F. R., Pereira, C. & Barros, L. Sustainable recovery of preservative and bioactive compounds from food industry bioresidues. *Antioxidants* **10**, (2021).
2. Amit, S. K., Uddin, M. M., Rahman, R., Islam, S. M. R. & Khan, M. S. A review on mechanisms and commercial aspects of food preservation and processing. *Agric. Food Secur.* **6**, (2017).
3. Ariyamuthu, R., Rupa Albert, V. & Je, S. An Overview of Food Preservation Using Conventional and Modern Methods. *J. Food Nutr. Sci.* **10**, 70–79 (2022).
4. Ghoshal, G. Emerging Food Processing Technologies. in *Food Processing for Increased Quality and Consumption* 29–65 (Elsevier Inc., 2018).
5. *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages*. (Springer, 2009).
6. Abid, J., Rehman, A., Touqeer, M. M., Mudabbar, S., Shah, H., Ayub, M. U., Ali, H. U., Ahmed, S. & Ahmad, N. Food preservation methods and use of nanomaterials as a preservative. *J. Xi'an Shiyou Univ. Nat. Sci. Ed.* **18**, (2022).
7. Angane, M., Swift, S., Huang, K., Butts, C. A. & Quek, S. Y. Essential Oils and Their Major Components: An Updated Review on Antimicrobial Activities, Mechanism of Action and Their Potential Application in the Food Industry. *Foods* **11**, (2022).
8. Chiozzi, V., Agriopoulou, S. & Varzakas, T. Advances , Applications , and Comparison of Thermal (Pasteurization, Sterilization, and Aseptic Packaging) against Non-Thermal (Ultrasounds, UV Radiation, Ozonation, High Hydrostatic Pressure) Technologies in Food Processing. *Appl. Sci.* **12**, (2022).
9. Nowakowska, M. B., Selby, K., Przykopanski, A., Krüger, M., Krez, N., Dorner, B. G., Dorner, M. B., Jin, R., Minton, N. P., Rummel, A. & Lindström, M. Construction and validation of safe Clostridium botulinum Group II surrogate strain producing inactive botulinum neurotoxin type E toxoid. *Sci. Rep.* **12**, (2022).
10. Cardoso, P. da S., Fagundes, J. M., Couto, D. S., Pires, E. de M., Guimarães, C. E. D., Ribeiro, C. D. F. & Otero, D. M. From Curing To Smoking: Processes and Techniques for the Production of Pastrami. *Brazilian J. Dev.* **6**, 61511–61520

(2020).

11. Sridhar, A., Ponnuchamy, M., Kumar, P. S. & Kapoor, A. Food preservation techniques and nanotechnology for increased shelf life of fruits, vegetables, beverages and spices: a review. *Environ. Chem. Lett.* **19**, 1715–1735 (2021).
12. Lianou, A., Panagou, E. Z. & Nychas, G. E. Microbiological Spoilage of Foods and Beverages. in *The Stability and Shelf Life of Food* (ed. Subramaniam, P.) 3–42 (Woodhead Publishing, 2016).
13. Rawat, S. Food Spoilage : Microorganisms and their prevention. *Asian J. Plant Sci. Res.* **5**, 47–56 (2015).
14. Alves, A., Viveiros, C., Lopes, J., Nogueira, A., Pires, B., Afonso, A. F. & Teixeira, C. Microbiological Contamination in Different Food Service Units Associated with Food Handling. *Appl. Sci.* **11**, (2021).
15. Teshome, E., Forsido, S. F., Rupasinghe, H. P. V. & Olika Keyata, E. Potentials of Natural Preservatives to Enhance Food Safety and Shelf Life: A Review. *Sci. World J.* **2022**, (2022).
16. Lopez, M. E. S., Gontijo, M. T. P., Boggione, D. M. G., Albino, L. A. A., Batalha, L. S. & Mendonça, R. C. S. Microbiological Contamination in Foods and Beverages: Consequences and Alternatives in the Era of Microbial Resistance. in *Microbial Contamination and Food Degradation* (eds. Holban, A. M. & Grumezescu, A. M.) 49–84 (Academic Press, 2018).
17. da Silva, B. D., Bernardes, P. C., Pinheiro, P. F., Fantuzzi, E. & Roberto, C. D. Chemical composition, extraction sources and action mechanisms of essential oils: Natural preservative and limitations of use in meat products. *Meat Sci.* **176**, (2021).
18. Meenu, M., Padhan, B., Patel, M., Patel, R. & Xu, B. Antibacterial activity of essential oils from different parts of plants against Salmonella and Listeria spp. *Food Chem.* **404**, **B**, (2023).
19. Maurya, A., Singh, V. K., Das, S., Prasad, J., Kedia, A., Upadhyay, N., Dubey, N. K. & Dwivedy, A. K. Essential Oil Nanoemulsion as Eco-Friendly and Safe Preservative: Bioefficacy Against Microbial Food Deterioration and Toxin Secretion, Mode of Action, and Future Opportunities. *Front. Microbiol.* **12**, (2021).
20. Osek, J., Lachtara, B. & Wiczorek, K. Listeria monocytogenes – How This

- Pathogen Survives in Food-Production Environments? *Front. Microbiol.* **13**, (2022).
21. John, A., Id, K. & Okoh, A. I. Assessment of multidrug-resistant *Listeria monocytogenes* in milk and milk product and One Health perspective. *PLoS One* **17**, (2022).
 22. Kim, S. H., Chelliah, R., Ramakrishnan, S. R., Perumal, A. S., Bang, W. S., Rubab, M., Daliri, E. B. M., Barathikannan, K., Elahi, F., Park, E., Jo, H. Y., Hwang, S. B. & Oh, D. H. Review on Stress Tolerance in *Campylobacter jejuni*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **10**, (2021).
 23. Iannino, F., Di Donato, G., Ruggieri, E., Salucci, S., De Massis, F. & Di Giannatale, E. *Campylobacter* infections, a significant issue of veterinary urban hygiene: dog-related risk factors. *Vet. Ital.* **53**, 111–120 (2017).
 24. Ansarifard, E., Riahi, S. M., Tasara, T., Sadighara, P. & Zeinali, T. *Campylobacter* prevalence from food, animals, human and environmental samples in Iran : a systematic review and meta - analysis. *BMC Microbiol.* **23**, (2023).
 25. Gulzar, M. & Zehra, A. *Staphylococcus aureus* : A brief review. *Int. J. Vet.* **4**, (2018).
 26. Howden, B. P., Giulieri, S. G., Wong, T., Lung, F., Baines, S. L., Sharkey, L. K., Lee, J. Y. H., Hachani, A., Monk, I. R. & Stinear, T. P. *Staphylococcus aureus* host interactions and adaptation. *Nat. Rev. Microbiol.* (2023).
 27. Cheung, G. Y. C., Bae, J. S. & Otto, M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence* **12**, 547–569 (2021).
 28. Ramos, S., Silva, V., Dapkevicius, M. de L. E., Caniça, M., Tejedor-Junco, M. T., Igrejas, G. & Poeta, P. *Escherichia coli* as Commensal and Pathogenic Bacteria among Food-Producing Animals : Health Implications of Extended Spectrum β - Lactamase (ESBL) Production. *Animals* **10**, (2020).
 29. Martinez-medina, M. Special Issue : Pathogenic *Escherichia coli* : Infections and Therapies. *Antibiotics* **10**, (2021).
 30. Denamur, E., Clermont, O., Bonacorsi, S. & Gordon, D. The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* **19**, 37–54 (2021).
 31. Hegazy, W. A. H., Salem, I. M., Alotaibi, H. F., Khafagy, E. & Ibrahim, D. Terazosin Interferes with Quorum Sensing and Type Three Secretion System and

- Diminishes the Bacterial Espionage to Mitigate the Salmonella Typhimurium Pathogenesis. *Antibiotics* **11**, (2022).
32. Yang, Y., Li, J., Yin, Y., Guo, D., Jin, T., Guan, N., Shi, Y., Xu, Y. & Liang, S. Antibiofilm activity of coenzyme Q₁₀ against Salmonella Typhimurium and its effect on adhesion – invasion and survival – replication. *Appl. Microb. Cell Physiol.* **103**, 8545–8557 (2019).
 33. Lv, X. & Cheng, J. Evaluation of the Effects of Cold Plasma on Cell Membrane Lipids and Oxidative Injury of Salmonella typhimurium. *Molecules* **27**, (2022).
 34. De Sousa, T., Hébraud, M., Dapkevicius, M. L. N. E., Maltez, L., Pereira, J. E., Capita, R., Alonso-calleja, C., Igrejas, G. & Poeta, P. Genomic and Metabolic Characteristics of the Pathogenicity in Pseudomonas aeruginosa. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, (2021).
 35. Tam, M., Wibowo, D. & Rehm, B. H. A. Pseudomonas aeruginosa Biofilms. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, (2020).
 36. Karpiński, T. M. Efficacy of octenidine against Pseudomonas aeruginosa strains. *Eur. J. Biol. Res.* **9**, 135–140 (2019).
 37. Lossouarn, J., Briet, A., Moncaut, E., Furlan, S., Bouteau, A., Son, O., Leroy, M., Dubow, M. S., Lecointe, F., Serror, P. & Petit, M. Enterococcus faecalis Countermeasures Defeat a Virulent Picovirinae Bacteriophage. *Viruses* **11**, (2019).
 38. Cheng, M., Liang, J., Zhang, Y., Hu, L., Gong, P., Cai, R., Zhang, L., Zhang, H., Ge, J., Ji, Y., Guo, Z., Feng, X., Sun, C., Yang, Y., Lei, L., Han, W. & Gu, J. The Bacteriophage EF-P29 Efficiently Protects against Lethal Vancomycin-Resistant Enterococcus faecalis and Alleviates Gut Microbiota Imbalance in a Murine Bacteremia Model. *Front. Microbiol.* **8**, (2017).
 39. Rio, B., Sánchez-llana, E., Martínez, N., Fernández, M., Ladero, V. & Alvarez, M. A. Isolation and Characterization of Enterococcus faecalis- Infecting Bacteriophages From Different Cheese Types. *Front. Microbiol.* **11**, (2021).
 40. Villalobos-delgado, L. H., Nevárez-Moorillon, G. V., Caro, I., Quinto, E. J. & Mateo, J. Natural antimicrobial agents to improve foods shelf life. in *Food Quality and Shelf Life* (ed. Galanakis, C. M.) 125–157 (Academic Press, 2019).
 41. Nair, M. S., Upadhyaya, I., Anne, M. & Amalaradjou, R. Antimicrobial Food Additives and Disinfectants: Mode of Action and Microbial Resistance Mechanisms. in *Foodborne Pathogens and Antibiotic Resistance* (ed. Singh, O.

- V.) 275–301 (2016).
42. Bensid, A., Abed, N. El, Houicher, A., Regenstein, J. M. & Özogul, F. Antioxidant and antimicrobial preservatives: Properties, mechanism of action and applications in food – a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **62**, (2022).
 43. Duda-chodak, A. & Tarko, T. Antimicrobial Compounds in Food Packaging. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, (2023).
 44. Khaneghah, A. M., Mohammad, S., Hashemi, B., Eş, I., Fracassetti, D. & Limbo, S. Efficacy of Antimicrobial Agents for Food Contact Applications: Biological Activity, Incorporation into Packaging, and Assessment Methods: A Review. *J. Food Prot.* **81**, 1142–1156 (2018).
 45. Bener, M., Şen, F. B. & Apak, R. Novel pararosaniline based optical sensor for the determination of sulfite in food extracts. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **226**, (2020).
 46. Estévez, M., Li, Z., Soladoye, O. P. & Van-Hecke, T. Health Risks of Food Oxidation. in *Advances in Food and Nutrition Research* (ed. Toldrá, F.) vol. 82 45–81 (Academic Press, 2017).
 47. *Advances in food biochemistry*. (CRC Press, 2010).
 48. Jackson, V. & Penumetcha, M. Dietary oxidised lipids, health consequences and novel food technologies that thwart food lipid oxidation: an update. *Int. J. Food Sci. Technol.* **54**, 1981–1988 (2019).
 49. Forman, H. J. & Zhang, H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* **20**, 689–709 (2021).
 50. Luo, J., Mills, K., le Cessie, S., Noordam, R. & van Heemst, D. Ageing, age-related diseases and oxidative stress: What to do next? *Ageing Res. Rev.* **57**, (2020).
 51. Domínguez, R., Pateiro, M., Gagaoua, M., Barba, F. J., Zhang, W. & Lorenzo, J. M. A comprehensive Review on Lipid Oxidation in Meat and Meat Products. *Antioxidants* **8**, (2019).
 52. Neha, K., Haider, M. R., Pathak, A. & Yar, M. S. Medicinal prospects of antioxidants: A review. *Eur. J. Med. Chem.* **178**, 687–704 (2019).
 53. Gutiérrez-Del-río, I., López-Ibáñez, S., Magadán-Corpas, P., Fernández-Calleja, L., Pérez-Valero, A., Tuñón-Granda, M., Miguélez, E. M., Villar, C. J. & Lombó, F. Terpenoids and Polyphenols as Natural Antioxidant Agents in Food Preservation.

- Antioxidants* **10**, (2021).
54. Shahidi, F. & Zhong, Y. Measurement of antioxidant activity. *J. Funct. Foods* **18**, **B**, 757–781 (2015).
 55. Oroian, M. & Escriche, I. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Res. Int.* **74**, 10–36 (2015).
 56. Xu, X., Liu, A., Hu, S., Ares, I., Martínez-Larrañaga, M. R., Wang, X., Martínez, M., Anadón, A. & Martínez, M. A. Synthetic phenolic antioxidants: Metabolism, hazards and mechanism of action. *Food Chem.* **353**, (2021).
 57. Nehme, R., Andrés, S., Pereira, R. B., Jemaa, M. B., Bouhallab, S., Ceciliani, F., López, S., Rahali, F. Z., Ksouri, R., Pereira, D. M. & Abdennebi-najar, L. Essential Oils in Livestock: From Health to Food Quality. *Antioxidants* **10**, (2021).
 58. Bunse, M., Daniels, R., Gründemann, C., Heilmann, J., Kammerer, D. R., Keusgen, M., Lindequist, U., Melzig, M. F., Morlock, G. E., Schulz, H., Schweiggert, R., Simon, M., Stintzing, F. C. & Wink, M. Essential Oils as Multicomponent Mixtures and Their Potential for Human Health and Well-Being. *Front. Pharmacol.* **13**, (2022).
 59. Ramsey, J. T., Shropshire, B. C., Nagy, T. R., Chambers, K. D., Li, Y. & Korach, K. S. Essential oils and health. *Yale J. Biol. Med.* **93**, 291–305 (2020).
 60. Plant, R. M., Dinh, L., Argo, S. & Shah, M. The Essentials of Essential Oils. *Adv. Pediatr.* **66**, 111–122 (2019).
 61. Stratakos, A. C. & Koidis, A. Methods for Extracting Essential Oils. in *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety* (ed. Preedy, V. R.) 31–38 (Academic Press, 2016).
 62. Sadgrove, N. J., Padilla-González, G. F. & Phumthum, M. Fundamental Chemistry of Essential Oils and Volatile Organic Compounds, Methods of Analysis and Authentication. *Plants* **11**, (2022).
 63. Irmak, S. & Erbatur, O. Additives for environmentally compatible active food packaging. in *Environmentally Compatible Food Packaging* (ed. Chiellini, E.) 263–293 (Woodhead Publishing Limited, 2008).
 64. Dhifi, W., Bellili, S., Jazi, S., Bahloul, N. & Mnif, W. Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. *Medicines* **3**, (2016).

65. De Groot, A. C. & Schmidt, E. Essential Oils, Part III: Chemical Composition. *Dermatitis* **27**, 161–169 (2016).
66. Sadgrove, N. J., Padilla-González, G. F., Leuner, O., Melnikovova, I. & Fernandez-Cusimamani, E. Pharmacology of Natural Volatiles and Essential Oils in Food, Therapy, and Disease Prophylaxis. *Front. Pharmacol.* **12**, (2021).
67. Purkait, S., Bhattacharya, A., Bag, A. & Chattopadhyay, R. R. Synergistic antibacterial, antifungal and antioxidant efficacy of cinnamon and clove essential oils in combination. *Arch. Microbiol.* **202**, 1439–1448 (2020).
68. Vieira, M., Bessa, L. J., Martins, M. R., Arantes, S., Teixeira, A. P. S., Mendes, A., da Costa, P. M. & Belo, A. D. F. Chemical Composition, Antibacterial, Antibiofilm and Synergistic Properties of Essential Oils from *Eucalyptus globulus* Labill. and Seven Mediterranean Aromatic Plants. *Chem. Biodivers.* **14**, (2017).
69. Ayari, S., Shankar, S., Follett, P., Hossain, F. & Lacroix, M. Potential synergistic antimicrobial efficiency of binary combinations of essential oils against *Bacillus cereus* and *Paenibacillus amylolyticus*-Part A. *Microb. Pathog.* **141**, (2020).
70. Sharma, S., Barkauskaite, S., Jaiswal, A. K. & Jaiswal, S. Essential oils as additives in active food packaging. *Food Chem.* **343**, 128403 (2021).
71. Llana-Ruiz-Cabello, M., Pichardo, S., Maisanaba, S., Puerto, M., Prieto, A. I., Gutiérrez-Praena, D., Jos, A. & Cameán, A. M. In vitro toxicological evaluation of essential oils and their main compounds used in active food packaging: A review. *Food Chem. Toxicol.* **81**, 9–27 (2015).
72. Avramescu, S. M., Butean, C., Popa, C. V., Ortan, A., Moraru, I. & Temocico, G. Edible and functionalized films/coatings-performances and perspectives. *Coatings* **10**, (2020).
73. Carpena, M., Nuñez-Estevez, B., Soria-Lopez, A., Garcia-Oliveira, P. & Prieto, M. A. Essential oils and their application on active packaging systems: A review. *Resources* **10**, (2021).
74. Kumar, K. V. P., W, J. S. & Kumari, B. A. Active packaging systems in food packaging for enhanced shelf life. *J. Pharmacogn. Phytochem.* **7**, 2044–2046 (2018).
75. Vilela, C., Kurek, M., Hayouka, Z., Röcker, B., Yildirim, S., Antunes, M. D. C., Nilsen-Nygaard, J., Pettersen, M. K. & Freire, C. S. R. A concise guide to active agents for active food packaging. *Trends Food Sci. Technol.* **80**, 212–222 (2018).

76. Kumar, A., Gautam, R. D., Kumar, R., Chauhan, R., Kumar, M., Singh, S., Kumar, D., Singh, S. & Kumar, A. Floral studies of palmarosa [*Cymbopogon martinii* (Roxb.) W. Watson] and chemical insights during inflorescence development. *Ind. Crops Prod.* **171**, (2021).
77. Mieso, B. & Befu, A. Physical Characteristics of the Essential Oil Extracted from Released and Improved Lemongrass Varieties, Palmarosa and Citronella Grass. *Agric. Food Sci. Res.* **7**, 65–68 (2020).
78. Jummes, B., Sganzerla, W. G., da Rosa, C. G., Noronha, C. M., Nunes, M. R., Bertoldi, F. C. & Barreto, P. L. M. Antioxidant and antimicrobial poly-ε-caprolactone nanoparticles loaded with *Cymbopogon martinii* essential oil. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **23**, (2020).
79. SÖNMEZ GÜRER, E. & TUNC, T. Investigation of Antimicrobial and Cytotoxic Activities of Palmarosa (*Cymbopogon martinii*) Essential Oil. *Cumhur. Sci. J.* **43**, 594–599 (2022).
80. Promila. A Review on The Medicinal and Aromatic Plant *Cymbopogon martinii* (Roxb.) Watson (Palmarosa). *Int. J. Chem. Stud.* **6**, 1311–1315 (2018).
81. Andrade, B. F. M. T., Barbosa, L. N., Alves, F. C. B., Albano, M., Rall, V. L. M., Sforcin, J. M., Fernandes, A. A. H. & Fernandes, A. The antibacterial effects of *Melaleuca alternifolia*, *Pelargonium graveolens* and *Cymbopogon martinii* essential oils and major compounds on liquid and vapor phase. *J. Essent. Oil Res.* **28**, 227–233 (2016).
82. Önem, E. New green solutions against bacterial resistance: palmarosa (*Cymbopogon martinii*) essential oil and quorum sensing. *Sustain. Chem. Pharm.* **25**, (2022).
83. Rapisarda, A. & Germanò, M. P. Citrus × bergamia risso & poiteau botanical classification, morphology, and anatomy. in *Citrus Bergamia: Bergamot and its Derivatives* (eds. Dugo, G. & Bonaccorsi, I.) 9–24 (CRC Press, 2013).
84. Dosoky, N. S. & Setzer, W. N. Biological activities and safety of citrus spp. Essential oils. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).
85. Quirino, A., Giorgi, V., Palma, E., Marascio, N., Morelli, P., Maletta, A., Divenuto, F., De Angelis, G., Tancre, V., Nucera, S., Gliozzi, M., Musolino, V., Carresi, C., Mollace, V., Liberto, M. C. & Matera, G. Citrus bergamia: Kinetics of Antimicrobial Activity on Clinical Isolates. *Antibiotics* **11**, (2022).

86. Marchese, E., D'onofrio, N., Balestrieri, M. L., Castaldo, D., Ferrari, G. & Donsì, F. Bergamot essential oil nanoemulsions: antimicrobial and cytotoxic activity. *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* **75**, 279–290 (2020).
87. Navarra, M., Mannucci, C., Delbò, M. & Calapai, G. Citrus bergamia essential oil: From basic research to clinical application. *Front. Pharmacol.* **6**, (2015).
88. González-Mas, M. C., Rambla, J. L., López-Gresa, M. P., Amparo Blázquez, M. & Granell, A. Volatile compounds in citrus essential oils: A comprehensive review. *Front. Plant Sci.* **10**, (2019).
89. Luís, Â., Ramos, A. & Domingues, F. Pullulan films containing rockrose essential oil for potential food packaging applications. *Antibiotics* **9**, (2020).
90. Karkouri, J. El., Bouhrim, M., Kamaly, O. M. Al., Mechchate, H., Kchibale, A., Adadi, I., Amine, S., Ismaili, S. A. & Zair, T. Chemical Composition, Antibacterial and Antifungal Activity of the Essential Oil from *Cistus ladanifer* L. *Plants* **10**, (2021).
91. Xavier, V., Finimundy, T. C., Heleno, S. A., Amaral, J. S., Calhelha, R. C., Vaz, J., Pires, T. C. S. P., Mediavilla, I., Esteban, L. S., Ferreira, I. C. F. R. & Barros, L. Chemical and Bioactive Characterization of the Essential Oils Obtained from Three Mediterranean Plants. *Molecules* **26**, (2021).
92. Raimundo, J. R., Frazão, D. F., Domingues, J. L., Quintela-Sabarís, C., Dentinho, T. P., Anjos, O., Alves, M. & Delgado, F. Neglected Mediterranean plant species are valuable resources: the example of *Cistus ladanifer*. *Planta* **248**, 1351–1364 (2018).
93. Alves-Ferreira, J., Duarte, L. C., Fernandes, M. C., Pereira, H. & Carvalheiro, F. *Cistus ladanifer* as a Potential Feedstock for Biorefineries: A Review. *Energies* **16**, (2023).
94. Mastino, P. M., Marchetti, M., Costa, J. & Usai, M. Comparison of essential oils from *Cistus* species growing in Sardinia. *Nat. Prod. Res.* **31**, 299–307 (2016).
95. Cabral, C., Miranda, M., Gonçalves, M. J., Cavaleiro, C., Cruz, M. T. & Salgueiro, L. Assessment of safe bioactive doses of *Foeniculum vulgare* Mill. essential oil from Portugal. *Nat. Prod. Res.* **31**, 2654–2659 (2017).
96. Jadid, N., Widodo, A. F., Ermavitalini, D., Sa'adah, N. N., Gunawan, S. & Nisa, C. The medicinal Umbelliferae plant Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.): Cultivation, traditional uses, phytopharmacological properties, and application in animal

- husbandry. *Arab. J. Chem.* **16**, (2023).
97. Javed, R., Hanif, M. A., Ayub, M. A. & Rehman, R. Fennel. in *Medicinal Plants of South Asia: Novel Sources for Drug Discovery* (eds. Asif Hanif, M., Mumtaz Khan, M., Nawaz, H. & J. Byrne, H.) 241–256 (Elsevier, 2020).
 98. Khaleil, M. M., Alnoman, M. M., Elrazik, E. S. A., Zagloul, H. & Khalil, A. M. A. Essential oil of *Foeniculum vulgare* mill. as a green fungicide and defense-inducing agent against fusarium root rot disease in *Vicia faba* L. *Biology (Basel)*. **10**, (2021).
 99. Abdellaoui, M., Bouhlali, E. dine T., Derouich, M. & El-Rhaffari, L. Essential oil and chemical composition of wild and cultivated fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.): A comparative study. *South African J. Bot.* **135**, 93–100 (2020).
 100. Sharopov, F., Valiev, A., Satyal, P., Gulmurodov, I., Yusufi, S., Setzer, W. N. & Wink, M. Cytotoxicity of the essential oil of fennel (*Foeniculum vulgare*) from tajikistan. *Foods* **6**, 1–11 (2017).
 101. Wojtunik-kulesza, K. A. Toxicity of Selected Monoterpenes and Essential Oils Rich in These Compounds. *Molecules* **27**, (2022).
 102. Wojtunik, K. A., Ciesla, L. M. & Waksmundzka-Hajnos, M. Model studies on the antioxidant activity of common terpenoid constituents of essential oils by means of the 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *J. Agric. Food Chem.* **62**, 9088–9094 (2014).
 103. Skroza, D., Šimat, V., Vrdoljak, L., Jolić, N., Skelin, A., Čagalj, M., Frleta, R. & Mekinić, I. G. Investigation of Antioxidant Synergisms and Antagonisms among Phenolic Acids in the Model Matrices Using FRAP and ORAC Methods. *Antioxidants* **11**, (2022).
 104. Alcalde, B., Granados, M. & Saurina, J. Exploring the antioxidant features of polyphenols by spectroscopic and electrochemical methods. *Antioxidants* **8**, (2019).
 105. Munteanu, I. G. & Apetrei, C. Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, (2021).
 106. Siddeeg, A., AlKehayez, N. M., Abu-Hiamed, H. A., Al-Sanea, E. A. & AL-Farga, A. M. Mode of action and determination of antioxidant activity in the dietary sources: An overview. *Saudi J. Biol. Sci.* **28**, 1633–1644 (2021).

107. Arce-Amezquita, P. M., Beltrán-Morales, F. A., Manríquez-Rivera, G. A., Cota-Almanza, M. E., Quian-Torres, A. & Peralta-Olachea, R. G. Nutritional value of conventional, wild and organically produced fruits and vegetables available in Baja California Sur markets. *Terra Latinoam.* **37**, 401–406 (2019).
108. Swapnil, P., Meena, M., Singh, S. K., Dhuldhaj, U. P., Harish, Marwal, A Vital roles of carotenoids in plants and humans to deteriorate stress with its structure, biosynthesis, metabolic engineering and functional aspects. *Curr. Plant Biol.* **26**, (2021).
109. Stutz, H., Bresgen, N. & Eckl, P. M. Analytical tools for the analysis of β -carotene and its degradation products. *Free Radic. Res.* **49**, 650–680 (2015).
110. García-Nicolás, M., Ledesma-escobar, C. A. & Priego-Capote, F. Spatial Distribution and Antioxidant Activity of Extracts from Citrus Fruits. *Antioxidants* **12**, (2023).
111. Balouiri, M., Sadiki, M. & Ibnsouda, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J. Pharm. Anal.* **6**, 71–79 (2016).
112. Costa, P., Gomes, A. T. P. C., Braz, M., Pereira, C. & Almeida, A. Application of the resazurin cell viability assay to monitor *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* inactivation mediated by phages. *Antibiotics* **10**, (2021).
113. Divito, M., Miller, W., Uzarski, J. & Wertheim, J. Essential Design Considerations for the Resazurin Reduction Assay to Noninvasively Quantify Cell Expansion within Perfused Extracellular Matrix Scaffolds. *Biomaterials* **129**, 163–175 (2017).
114. Luís, Â. & Domingues, F. Screening of the potential bioactivities of pennyroyal (*Mentha pulegium* L.) essential oil. *Antibiotics* **10**, (2021).
115. Luís, Â., Duarte, A. P., Pereira, L. & Domingues, F. Interactions between the major bioactive polyphenols of berries: effects on antioxidant properties. *Eur. Food Res. Technol.* **244**, (2018).
116. Bekka-Hadji, F., Bombarda, I., Djoudi, F., Bakour, S. & Touati, A. Chemical Composition and Synergistic Potential of *Mentha pulegium* L. and *Artemisia herba alba* Asso. Essential Oils and Antibiotic against Multi-Drug Resistant Bacteria. *Molecules* **27**, (2022).
117. Orchard, A., van Vuuren, S. F., Viljoen, A. M. & Kamatou, G. The in vitro antimicrobial evaluation of commercial essential oils and their combinations

- against acne. *Int. J. Cosmet. Sci.* **40**, 226–243 (2018).
118. Devi, M. A., Sahoo, D., Singh, T. B. & Rajashekar, Y. Toxicity, repellency and chemical composition of essential oils from *Cymbopogon* species against red flour beetle *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae). *J. Consum. Prot. Food Saf.* **15**, 181–191 (2020).
 119. Caputo, L., Cornara, L., Bazzicalupo, M., De Francesco, C., De Feo, V., Trombetta, D. & Smeriglio, A. Chemical composition and biological activities of essential oils from peels of three Citrus species. *Molecules* **25**, (2020).
 120. Pérez-Izquierdo, C., Serrano-Pérez, P. & Rodríguez-Molina, M. del C. Chemical composition, antifungal and phytotoxic activities of *Cistus ladanifer* L. essential oil and hydrolate. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **45**, (2022).
 121. Servi, H., Şen, A., Yildirim Servi, E. & Doğan, A. Chemical composition and biological activities of essential oils of *Foeniculum vulgare* Mill. And *Daucus carota* L. growing wild in Turkey. *J. Res. Pharm.* **25**, 142–152 (2021).
 122. Tsai, M., Lin, C., Lin, W. & Yang, C. Antimicrobial , Antioxidant , and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils from Five Selected Herbs. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **75**, 1977–1983 (2011).
 123. Farhath, M. S. S., Vijaya, P. P. & Vimal, M. Antioxidant activity of Geraniol, Geranial acetate, Gingerol and Eugenol. *Res. Pharm.* **3**, 519–524 (2013).
 124. Wang, C. Y., Chen, Y. W. & Hou, C. Y. Antioxidant and antibacterial activity of seven predominant terpenoids. *Int. J. Food Prop.* **22**, 229–237 (2019).
 125. Noshad, M., Behbahani, B. A. & Nikfarjam, Z. Chemical composition, antibacterial activity and antioxidant activity of Citrus bergamia essential oil: Molecular docking simulations. *Food Biosci.* **50**, (2022).
 126. Cutillas, A. B., Carrasco, A., Martinez-Gutierrez, R., Tomas, V. & Tudela, J. *Thymus mastichina* L. essential oils from Murcia (Spain): Composition and antioxidant, antienzymatic and antimicrobial bioactivities. *PLoS One* **13**, (2018).
 127. Wang, W., Wu, N., Zu, Y. G. & Fu, Y. J. Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. *Food Chem.* **108**, 1019–1022 (2008).
 128. Badr, M. M., Badawy, M. E. I. & Taktak, N. E. M. Characterization, antimicrobial activity, and antioxidant activity of the nanoemulsions of *Lavandula spica*

- essential oil and its main monoterpenes. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **65**, (2021).
129. Sharma, S., Gupta, J., Prabhakar, P. K., Gupta, P., Solanki, P. & Rajput, A. Phytochemical Repurposing of Natural Molecule: Sabinene for Identification of Novel Therapeutic Benefits Using in Silico and in Vitro Approaches. *Assay Drug Dev. Technol.* **17**, 339–351 (2019).
 130. Upadhyay, N., Singh, V. K., Dwivedy, A. K., Das, S., Chaudhari, A. K. & Dubey, N. K. *Cistus ladanifer* L. essential oil as a plant based preservative against molds infesting oil seeds, aflatoxin B₁ secretion, oxidative deterioration and methylglyoxal biosynthesis. *LWT* **92**, 395–403 (2018).
 131. Nicoletti, M., Maggi, F., Papa, F., Vittori, S., Quassinti, L., Bramucci, M., Lupidi, G., Petrelli, D., Vitali, L. A., Ralaibia, E. & Rasoanaivo, P. In vitro biological activities of the essential oil from the ‘resurrection plant’ *Myrothamnus moschatus* (Baillon) Niedenzu endemic to Madagascar. *Nat. Prod. Res.* **26**, 2291–2300 (2012).
 132. Kazemi, M. Phytochemical and antioxidant properties of *Achillea Millefolium* from the eastern region of Iran. *Int. J. Food Prop.* **18**, 2187–2192 (2015).
 133. Khalid, S., Mhamed, R., Mohamed, B., Chakib, A. & Lhoussaine, E. R. Chemical Composition and Bioactivity of Essential Oils of Seed and Leaf from *Foeniculum vulgare* Mill cultivated in Southeast of Morocco. *J. Nat. Sci. Res.* **4**, (2014).
 134. Júnior, E. B. A., Formiga, R. de O., Serafim, C. A. de L., Araruna, M. E. C., Pessoa, M. L. de S., Vasconcelos, R. C., de Carvalho, T. G., de Jesus, T. G., Araújo, A. A., Junior, R. F. de A., Vieira, G. C., Sobral, M. V. & Batista, L. M. Estragole prevents gastric ulcers via cytoprotective, antioxidant and immunoregulatory mechanisms in animal models. *Biomed. Pharmacother.* **130**, (2020).
 135. Singh, S., Gupta, P. & Gupta, J. Virtual Structural Similarity Elucidates Bioactivity of Fenchone: A Phytochemical Enriched in Fennel Essential Oil. *Curr. Drug Discov. Technol.* **17**, 619–630 (2020).
 136. Aazza, S., Lyoussi, B. & Miguel, M. G. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of some commercial essential oils and their major compounds. *Molecules* **16**, 7672–7690 (2011).
 137. Scherer, M. M. de C., Marques, F. M., Figueira, M. M., Peisino, M. C. O., Schmitt, E. F. P., Kondratyuk, T. P., Endringer, D. C., Scherer, R. & Fronza, M. Wound healing activity of terpinolene and α -phellandrene by attenuating inflammation

- and oxidative stress in vitro. *J. Tissue Viability* **28**, 94–99 (2019).
138. Ciesla, L. M., Wojtunik-Kulesza, K. A., Oniszczyk, A. & Waksmundzka-Hajnos, M. Antioxidant synergism and antagonism between selected monoterpenes using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Flavour Fragr. J.* **31**, 412–419 (2016).
 139. Lodhia, M. H., Bhatt, K. R. & Thaker, V. S. Antibacterial activity of essential oils from palmarosa, evening primrose, lavender and tuberose. *Indian J. Pharm. Sci.* **71**, 134–136 (2009).
 140. Jirovetz, L., Buchbauer, G., Schmidt, E., Stoyanova, A. S., Denkova, Z., Nikolova, R. & Geissler, M. Purity, antimicrobial activities and olfactive evaluations of geraniol/nerol and various of their derivatives. *J. Essent. Oil Res.* **19**, 288–291 (2007).
 141. Cebi, N. & Erarslan, A. Determination of the Antifungal, Antibacterial Activity and Volatile Compound Composition of Citrus bergamia Peel Essential Oil. *Foods* **12**, (2023).
 142. Lv, F., Liang, H., Yuan, Q. & Li, C. In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. *Food Res. Int.* **44**, 3057–3064 (2011).
 143. Cristani, M., D'Arrigo, M., Mandalari, G., Castelli, F., Sarpietro, M. G., Micieli, D., Venuti, V., Bisignano, G., Saija, A. & Trombetta, D. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: Implications for their antibacterial activity. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 6300–6308 (2007).
 144. Soković, M., Glamočlija, J., Marin, P. D., Brkić, D. & van Griensven, L. J. L. D. Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an in vitro model. *Molecules* **15**, 7532–7546 (2010).
 145. Runyoro, D., Ngassapa, O., Vagionas, K., Aligiannis, N., Graikou, K. & Chinou, I. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of four *Ocimum* species growing in Tanzania. *Food Chem.* **119**, 311–316 (2010).
 146. Paraschos, S., Magiatis, P., Gousia, P., Economou, V., Sakkas, H., Papadopoulou, C. & Skaltsounis, A. L. Chemical investigation and antimicrobial properties of mastic water and its major constituents. *Food Chem.* **129**, 907–911 (2011).
 147. Santoyo, S., Cavero, S., Jaime, L., Ibañez, E., Señoráns, F. J. & Reglero, G. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. *J. Food Prot.* **68**, 790–795

(2005).

148. Friedman, M., Henika, P. R. & Mandrell, R. E. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *J. Food Prot.* **65**, 1545–1560 (2002).
149. Ahmad, W., Ansari, M. A., Yusuf, M., Amir, M., Wahab, S., Alam, P., Alomary, M. N., Alhuwayri, A. A., Khan, M., Ali, A., Warsi, M. H., Ashraf, K. & Ali, M. Antibacterial, Anticandidal, and Antibiofilm Potential of Fenchone: In Vitro, Molecular Docking and In Silico/ADMET Study. *Plants* **11**, (2022).
150. Ju, J., Xie, Y., Yu, H., Guo, Y., Cheng, Y., Qian, H & Yao, W. Synergistic interactions of plant essential oils with antimicrobial agents: a new antimicrobial therapy. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **62**, 1740–1751 (2020).
151. Ntalli, N. G., Ferrari, F., Giannakou, I. & Menkissoglu-Spiroudi, U. Synergistic and antagonistic interactions of terpenes against *Meloidogyne incognita* and the nematicidal activity of essential oils from seven plants indigenous to Greece. *Pest Manag. Sci.* **67**, 341–351 (2011).
152. Salinas, C., Florentín, G., Rodríguez, F., Alvarenga, N. & Guillén, R. Terpenes Combinations Inhibit Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus* by Interfering with Initial Adhesion. *Microorganisms* **10**, (2022).
153. Tserennadmid, R., Takó, M., Galgóczy, L., Papp, T., Pesti, M., Vágvölgyi, C., Almássy, K. & Krisch, J. Anti yeast activities of some essential oils in growth medium, fruit juices and milk. *Int. J. Food Microbiol.* **144**, 480–486 (2011).