



Aplicação de óleos essenciais e extratos aquosos de plantas no controlo de bactérias Gram-negativas produtoras de pigmentos em queijo

Rita Isabel Esteves Abreu

Orientadores

Professora Doutora Cristina Maria Baptista Santos Pintado

Professora Doutora Fernanda Maria Grácio Delgado Ferreira de Sousa

Relatório de Estágio apresentado à Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Inovação e Qualidade na Produção Alimentar, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Cristina Maria Baptista Santos Pintado e da Professora Doutora Fernanda Maria Grácio Delgado Ferreira de Sousa, do Instituto Politécnico de Castelo Branco.

Dezembro, 2018

Composição do júri

Presidente do júri

Doutor Celestino António Morais de Almeida

Vogais

Doutora Cristina Maria Baptista Santos Pintado

Professora Adjunta da Escola Superior Agrária de Castelo Branco

Doutor João Pedro Martins da Luz

Professor Coordenador da Escola Superior Agrária de Castelo Branco

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa,
nunca tem medo e nunca se arrepende”

Leonardo da Vinci

Agradecimentos

A realização deste trabalho foi conseguida com a ajuda, companheirismo, generosidade e boa vontade de muitos, por isso não queria deixar passar a oportunidade de agradecer a todos os que de algum modo contribuíram para a sua concretização.

Em primeiro lugar quero agradecer à Professora Doutora Cristina Pintado, docente da Escola Superior Agrária, pela oportunidade de realizar este estágio sob a sua orientação, por todo o apoio e dedicação ao longo do curso e estágio.

À Professora Doutora Fernanda Delgado, docente da Escola Superior Agrária, por toda a colaboração e dedicação ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

A todas as pessoas do Laboratório de Microbiologia da Escola Superior Agrária, em especial à Engenheira Helena Martins, Engenheira Manuela Goulão e Engenheira Conceição Amaro, por todos os conhecimentos transmitidos e por toda a disponibilidade, ajuda e amizade no decorrer de toda a fase laboratorial do trabalho.

Ao Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior por autorizar a utilização das suas instalações e equipamento necessários para a realização da extração e liofilização dos óleos essenciais. Principalmente à Joana Domingues pela grande ajuda que me deu no decorrer do estágio e obrigada pela amizade que construímos.

Ao David Frazão pela ajuda que me prestou na realização dos filmes edíveis.

À Queijaria da Soalheira de João Duarte Alves & Filhos, Lda. que gentilmente ofereceu os queijos e a solução antifúngica Enzilab.

À minha amiga Rita pelo apoio que me deu sempre.

Quero agradecer aos meus pais, por tudo o que têm feito por mim e por tudo o que passaram para eu poder concluir mais uma etapa, porque sem eles isto não seria possível. Um muito obrigado por estarem sempre comigo, pelos pais que são e por me darem esta oportunidade de seguir mestrado.

Aos restantes membros da família, incluindo o meu namorado por me acompanharem sempre e por me darem força para continuar e conseguir ser muito mais.

Por fim, agradeço a todos os meus amigos por serem as pessoas que são e por me proporcionarem momentos inesquecíveis e sem dúvida pelo apoio imenso que prestam e prestaram nos momentos mais difíceis e também naqueles de grande felicidade. Obrigada por permanecerem na minha vida!

Este trabalho foi cofinanciado pela FCT no âmbito do projeto SoS Valor – Soluções Sustentáveis para a Valorização de Produtos Naturais e Resíduos Industriais de Origem Vegetal

Resumo

O objetivo deste trabalho foi verificar a atividade antibacteriana de diferentes óleos essenciais e extratos aquosos das espécies *Cymbopogon citratus*, *Lavandula luisieri*, *Melaleuca armillaris*, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus mastichina* e *Thymus vulgaris*, contra onze diferentes culturas bacterianas das espécies *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Alcaligenes faecalis* e *Achromobacter xylosoxidans*, microrganismos previamente selecionados e identificados como tendo potencial para originar defeitos de cor na casca de queijos laborados com leite cru.

Os óleos essenciais e extratos aquosos utilizados foram obtidos por hidrodestilação em aparelho de Clevenger e testados numa primeira fase quanto à sua atividade antimicrobiana, usando o método de difusão em placa, com disco e com gota. Determinaram-se os valores da concentração mínima inibitória (MIC) e da concentração mínima bactericida (MBC) para os óleos essenciais e extratos aquosos que mostraram algum efeito inibidor nos ensaios prévios. A composição química do óleo de *Origanum vulgare* comercial foi efetuada através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS). Por fim, testaram-se várias formulações de revestimentos edíveis à base de quitosano e de isolado proteico de soro de leite, incorporados do óleo essencial de *Origanum vulgare*.

Dos resultados obtidos, o óleo de *Origanum vulgare* comercial foi o único que exerceu inibição total em todas as culturas testadas. Observou-se um comportamento heterogêneo entre as culturas usadas neste trabalho, com os valores mínimos de MIC e de MBC de 0,05% (v/v) verificados para cinco culturas (pertencentes às espécies *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Alcaligenes faecalis* e *Achromobacter xylosoxidans*). Relativamente aos extratos aquosos poucos foram os que apresentaram uma inibição total nos ensaios prévios. Ainda assim, foram selecionados os que mostraram ter algum efeito inibitório para a posterior determinação dos valores de MIC e dos MBC.

Com base nos resultados obtidos os MIC e nos MBC o óleo de *Origanum vulgare* comercial foi o escolhido para testar nas formulações filmogénicas, tendo-se selecionado previamente a matriz filmogénica à base de quitosano, ácido acético, glicerol e tween 20. A formulação desenvolvida foi aplicada a queijos, com o objetivo de testar na prática a inibição de microrganismos associados a defeitos de cor. O ensaio da aplicação do revestimento edível a queijos não foi conclusivo, necessitando este estudo de novos desenvolvimentos.

Palavras chave

Ação antibacteriana; Extratos aquosos; *Pseudomonas*; Óleos essenciais; Revestimentos edíveis; *Origanum vulgare*.

Abstract

The objective of this work was to verify the antibacterial activity of different essential oils and aqueous extracts of the species *Cymbogopon citratus*, *Lavandula luisieri*, *Melaleuca armillaris*, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus mastichina* and *Thymus vulgaris* against eleven different bacterial cultures of the species *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Alcaligenes faecalis* and *Achromobacter xylosoxidans*, microorganisms previously selected and identified as having the potential to cause color defects in the skin of cheeses processed with raw milk.

The essential oils and aqueous extracts used were obtained by hydrodistillation in a Clevenger apparatus and first tested for antimicrobial activity using the plate diffusion, disc and drop method. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bacterial concentration (MBC) values were determined for essential oils and aqueous extracts which showed some inhibitory effect in the previous assays. The chemical composition of commercial *Origanum vulgare* oil was carried out by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). Finally, various formulations of edible coatings based on chitosan and whey protein isolate, incorporated from the essential oil of *Origanum vulgare*, were tested.

From the results obtained, commercial *Origanum vulgare* oil was the only one that exerted total inhibition in all cultures tested. A heterogeneous behavior was observed between the cultures used in this study, with the minimum MIC and MBC values of 0.05% (v/v) verified for five cultures (belonging to the species *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Alcaligenes faecalis* and *Achromobacter xylosoxidans*). For the aqueous extracts few were those that showed a total inhibition in the previous tests. Nevertheless, we selected those that showed some inhibitory effect for the subsequent determination of MIC and MBC values.

Based on the results obtained in the MIC and MBC values of commercial *Origanum vulgare* oil was chosen for testing in the filmogenic formulations, the filmogenic matrix having been previously selected based on chitosan, acetic acid, glycerol and tween 20. The formulation developed was applied to cheeses, in order to test the inhibition of microorganisms associated with color defects. The application of the edible coating to cheeses was not conclusive, necessitating this study of new developments.

Keywords

Antibacterial action; Aqueous extracts; *Pseudomonas*; Essential oils; Edible coatings; *Origanum vulgare*.

Índice Geral

I.	Introdução.....	1
II.	Revisão bibliográfica.....	3
	1. Características das plantas estudadas usadas neste trabalho.....	3
	1.1. <i>Cymbogopon citratus</i>	3
	1.2. <i>Lavandula luisieri</i>	4
	1.3. <i>Melaleuca armillaris</i>	5
	1.4. <i>Origanum vulgare</i>	6
	1.5. <i>Rosmarinus officinalis</i>	6
	1.6. <i>Thymus mastichina</i>	7
	1.7. <i>Thymus vulgaris</i>	8
	2. Óleos essenciais e extratos aquosos.....	9
	3. Avaliação da atividade antimicrobiana.....	12
	4. Modo de ação antimicrobiana.....	13
	5. Características dos microrganismos usados neste estudo.....	16
	5.1. <i>Achromobacter xylosoxidans</i>	16
	5.2. <i>Alcaligenes faecalis</i>	16
	5.3. <i>Pseudomonas</i>	16
	6. Revestimentos edíveis.....	17
III.	Material e Métodos.....	19
	1. Extração dos óleos essenciais.....	19
	1.1. Recolha do material vegetal.....	19
	1.2. Obtenção do material vegetal.....	19
	2. Culturas bacterianas selecionadas.....	21
	3. Ensaio prévios da atividade antimicrobiana.....	22
	4. Método de microdiluição em caldo para avaliação da atividade antimicrobiana (MIC).....	22
	4.1. Preparação do meio de cultura.....	22
	4.2. Preparação da solução de resazurina.....	22
	4.3. Preparação dos extratos aquosos.....	23
	4.4. Preparação do inóculo.....	23
	4.5. Preparação da microplaca.....	23
	5. Avaliação da concentração mínima bactericida (MBC).....	24
	6. Revestimentos edíveis para controlo de microrganismos na casca do queijo.....	24
	6.1. Materiais edíveis na preparação dos revestimentos.....	24
	6.2. Desenvolvimentos das formulações.....	25
	6.3. Medição da espessura dos filmes.....	26
	6.4. Avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes.....	26
	6.5. Ensaio em queijo para avaliar a atividade antimicrobiana da formulação selecionada.....	27
	7. Identificação dos componentes químicos do óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i>	29
IV.	Resultados e discussão.....	30
	1. Rendimento de extração dos óleos essenciais e dos extratos aquosos.....	30
	2. Identificação dos componentes químicos do óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i>	31
	3. Ensaio prévios da atividade antimicrobiana.....	33
	4. Concentração mínima inibitória (MIC).....	34
	5. Concentração mínima bactericida (MBC).....	37

6.	Revestimentos/filmes com óleos essenciais para inibição de <i>Pseudomonas</i> e géneros afins.....	39
6.1.	Características visuais dos filmes estudados.....	39
6.2.	Medição da espessura do filme.....	40
6.3.	Avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes.....	41
6.4.	Ensaio em queijo para avaliar a atividade antimicrobiana da formulação selecionada.....	42
V.	Considerações finais.....	43
VI.	Referências bibliográficas.....	44
VII.	Anexos.....	50

Índice de figuras

Figura 1 – <i>Cymbopogon citratus</i>	3
Figura 2 – <i>Lavandula luisieri</i>	4
Figura 3 – <i>Melaleuca armillaris</i>	5
Figura 4 – <i>Origanum vulgare</i>	6
Figura 5 – <i>Rosmarinus officinalis</i>	7
Figura 6 – <i>Thymus mastichina</i>	8
Figura 7 – <i>Thymus vulgaris</i>	9
Figura 8 – Representação esquemática da técnica de extração por hidrodestilação.....	11
Figura 9 – Locais e mecanismos de ação antimicrobiana dos componentes dos óleos essenciais: degradação da parede celular; dano da membrana citoplasmática; dano das proteínas membranares; perda de componentes celulares; coagulação do citoplasma e diminuição da força protónica.....	14
Figura 10 – Estrutura molecular do quitosano.....	18
Figura 11- Processo de hidrodestilação de óleos essenciais. A) Aparelho de clewenger; B) Balão de fundo redondo acoplado ao aparelho de clewenger modificado; C) Obtenção do óleo essencial; D) Frasco com óleo essencial; F) Frasco com extrato aquoso liofilizado.....	20
Figura 12 - Esquema do teste de microdiluição em microplaca.....	24
Figura 13 – Diferentes siglas atribuídas às formulações que foram selecionadas para testar a atividade antimicrobiana.....	27
Figura 14 – Esquema do corte das amostras de queijo de ovelha usadas no ensaio com os revestimentos.....	28
Figura 15 – Rendimento médio dos óleos essenciais (%).....	30
Figura 16 – Rendimento médios dos extratos aquosos (%).....	31
Figura 17 – Cromatograma obtido em cromatografia gasosa do óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i> – cromatograma (A), e detalhes do cromatograma GC (B).....	31
Figura 18 – Exemplo de uma microplaca com extrato aquosos de <i>Thymus vulgaris</i> , <i>Rosmarinus officinalis</i> e <i>Melaleuca armillaris</i>	37
Figura 19 - Exemplo de uma microplaca com óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i> e <i>Cymbopogon citratus</i>	37

Lista de tabelas

Tabela 1 – Termos utilizados nos testes da atividade antimicrobiana.....	13
Tabela 2 – Nome comum e sigla utilizada na identificação de cada um dos óleos essenciais e extratos aquosos utilizados.....	21
Tabela 3 – Proveniência das culturas bacterianas testadas neste estudo.....	22
Tabela 4 – Diferentes formulações testadas para a obtenção de revestimentos/filmes edíveis à base de isolado proteico de soro de leite (WPI), quitosano (Ch), carboximetilcelulose (CMC) e metilcelulose (MC).....	26
Tabela 5 - Composição química (%) do óleo essencial de <i>Origanum vulgares</i>	32
Tabela 6 – Registo da atividade antimicrobiana de diferentes óleos essenciais sobre a multiplicação de diferentes culturas bacterianas do género <i>Pseudomonas</i> e géneros afins.....	33
Tabela 7 - Registo da atividade antimicrobiana de diferentes extratos aquosos sobre a multiplicação de diferentes culturas bacterianas do género <i>Pseudomonas</i> e géneros afins.....	34
Tabela 8 – Concentração mínima microbiana (MIC%; v/v) de diferentes óleos essenciais sobre a multiplicação de diferentes culturas bacterianas do género <i>Pseudomonas</i> e géneros afins.....	35
Tabela 9 - Concentração mínima microbiana (MIC%; v/v) de diferentes extratos aquosos sobre a multiplicação de diferentes culturas bacterianas do género <i>Pseudomonas</i> e géneros afins.....	36
Tabela 10 - Concentração mínima bactericida (MBC%; v/v) de diferentes óleos essenciais sobre a multiplicação de diferentes culturas bacterianas do género <i>Pseudomonas</i> e géneros afins.....	38
Tabela 11 - Concentração mínima bactericida (MBC%; v/v) de diferentes extratos aquosos sobre a multiplicação de diferentes culturas bacterianas do género <i>Pseudomonas</i> e géneros afins.....	39
Tabela 12 - Resultados das formulações dos filmes estudados.....	40
Tabela 13 – Espessura média (mm) dos filmes de quitosano (Ch).....	40
Tabela 14 – Resultados da avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes, através da medição dos diâmetros das zonas de inibição com quitosano a 1% e ácido acético a 3%.....	41
Tabela 15 – Resultados da avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes, através da medição dos diâmetros das zonas de inibição com quitosano a 1% e ácido acético a 1%.....	42

Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos

Ch: Quitosano

CBPBI: Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior

CM: Controlo do meio

CMC: Carboximetilcelulose

CN: Controlo negativo

CP: Controlo positivo

D: Disco

ESACB: Escola Superior Agrária de Castelo Branco

G: Gota

MBC: Concentração mínima bactericida (*Minimum Bactericidal Concentration*)

MC: Metilcelulose

MIC: Concentração mínima inibitória (*Minimum Inhibitory Concentration*)

Min: Minutos

PCA: *Plate Count Agar*

pH: Potencial hidrogeniónico

Ref^a: Referência

SH: Grupo sulfidrilo

WPI: Isolado proteico de soro de leite (*Whey Protein Isolate*)

I. Introdução

Nos últimos anos, tem-se assistido ao aumento da preferência dos consumidores por produtos mais naturais e minimamente processados. Para satisfazer esses requisitos, um dos maiores desafios da indústria de alimentos consiste em reduzir os aditivos químicos sintéticos na produção e conservação de alimentos. Nesse sentido, o uso alternativo de produtos vegetais naturais tem vindo a receber cada vez mais atenção, principalmente porque muitos desses produtos possuem propriedades funcionais adicionais.

Os óleos essenciais são agentes antimicrobianos de ocorrência natural encontrados em muitas plantas que se mostraram eficazes em diversas aplicações, diminuindo a multiplicação e a sobrevivência de diferentes microrganismos. Os óleos essenciais são os produtos aromáticos e voláteis do metabolismo secundário da planta, normalmente formados em células especiais ou grupos de células. Muitos destes óleos essenciais são bem conhecidos pelos seus efeitos antimicrobianos contra uma gama diversificada de microrganismos e podem ser utilizados para controlar os microrganismos patogénicos transmitidos principalmente por alimentos (Bajpai e Baek, 2016). A análise química dos óleos essenciais de espécies aromáticas tem revelado a presença de inúmeros compostos químicos, a maioria dos quais possui importantes propriedades antimicrobianas. Alguns óleos essenciais têm mostrado um potencial superior em comparação com os agentes antibacterianos químicos normalmente usados contra bactérias patogénicas transmitidas por alimentos (Bajpai e Baek, 2016).

A aplicação de vários óleos essenciais na indústria de alimentos tem-se mostrado eficaz na inibição do crescimento de agentes patogénicos e de alteração. Um exemplo é a aplicação de revestimentos/filmes edíveis, constituindo estes uma solução atual para prolongar a vida útil dos produtos sem afetar negativamente a perceção sensorial dos alimentos onde são aplicados (Song *et al.*, 2018).

As bactérias Gram-negativas são um dos grupos de microrganismos mais difíceis de inibir. São também um grupo de microrganismos que incluem agentes de alteração de alimentos, reduzindo a sua qualidade e valor comercial. É o que sucede com os queijos que apresentam manchas de cor na casca provocadas maioritariamente por bactérias do género *Pseudomonas*.

Este trabalho tem por objetivo estudar a atividade antibacteriana e as características químicas de diferentes óleos essenciais e extratos aquosos provenientes de plantas da região, a fim de valorizar estes recursos naturais, em particular no que toca à sua utilização na formulação de novos revestimentos edíveis como propriedades antimicrobianas. Para tal impuseram-se os seguintes objetivos específicos:

- ✓ Verificar a atividade antibacteriana de diferentes óleos essenciais e extratos aquosos (ensaio prévio), contra isolados dos géneros *Pseudomonas*, *Achromobacter* e *Alcaligenes*;
- ✓ Determinar, através do método de microdiluição em microplaca, a concentração mínima inibitória (MIC) dos óleos essenciais e extratos aquosos relativamente aos microrganismos selecionados;
- ✓ Determinar, através do método da gota em placa a concentração mínima bactericida (MBC) dos óleos essenciais e extratos aquosos relativamente aos microrganismos selecionados;

✓ Selecionar os óleos essenciais e/ou extratos aquosos que revelarem um melhor desempenho antibacteriano e desenvolver uma formulação para um revestimento edível que possa ser aplicada no controlo de microrganismos de alteração na superfície de queijos.

II. Revisão bibliográfica

1. Características das plantas usadas neste trabalho

1.1. *Cymbopogon citratus*

Cymbopogon citratus (DC.) Stapf, é uma espécie anteriormente descrita como *Andropogon citratus* por De Candolle e reclassificada por Otto Stapf. Pertence à família *Poaceae*. É amplamente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais de África, Ásia e América (Avoseh *et al.*, 2015), sendo proveniente do Sudoeste Asiático. O termo *Cymbopogon* deriva da palavra grega Kymbe e pogon que significa “arranjo de flores em espiga” e *citratus* deriva do latim, que significa folhas com aroma a limão (Figura 1). Em Portugal, é conhecida por erva-príncipe ou chá-príncipe (Negrelle e Gomes, 2007).



Figura 1 - *Cymbopogon citratus* (Uraku, 2015).

Poucas espécies da família *Poaceae* apresentam óleos essenciais e as mais importantes são precisamente as do género *Cymbopogon* (Ortiz *et al.*, 2002). O óleo essencial extraído de *Cymbopogon citratus* tem como principal componente o citral, composto pela mistura dos isómeros geranial e neral (65%-80%), além de limoneno, citronelol, β -mirceno e geraniol (Santos e Rao 2000).

Para não ocorrer uma diminuição na produção do óleo essencial, o solo não deverá ter falta de água, pelo que deve ser profundo e bem drenado, e o clima deverá ser húmido e quente. A colheita deverá ser efetuada quando o ápice das folhas exibir uma cor castanha-amarelada, isto acontece, entre os 9 e 11 meses após terem sido plantadas, pois é nesta etapa que as folhas expõem o máximo teor de óleo essencial (Tavares *et al.*, 2010).

Na medicina tradicional o *Cymbopogon citratus* é muito usado na forma de infusões preparadas a partir das suas folhas frescas ou secas (Negrelle e Gomes 2007). As raízes são a parte da planta menos utilizada e quando usada é sob a forma de decocto. Além destas aplicações é utilizado na aromoterapia, como condimentos na cozinha tradicional pelo seu sabor a limão, em bebidas, na perfumaria, na cosmética e ainda como conservante e inseticida (Asaolu *et al.*, 2009).

1.2. *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri*

A subespécie *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri* (Rozeira) Rozeira pertence à família *Lamiaceae* e é uma espécie característica da classe *Cisto-Lavanduletae*. É uma espécie pioneira em áreas recentemente ardidas, reproduzindo-se essencialmente, por semente. Foi descrita pela primeira vez por Rozeira, em 1949 como uma variedade de *Lavandula stoechas* L. (*L. stoechas* L. var. *luisieri* Rozeira) e depois, em 1964, como uma subespécie (*L. stoechas* L. subsp. *luisieri* (Rozeira) Rozeira). Esta planta é conhecida vulgarmente por rosmaninho, rosmaninho-menor, rosmaninha, rosmano, rasmoninho, rasmono, lavanda-portuguesa, cabeçuda, arçanha e tomelo (Delgado, 2010), sendo investigada em diferentes áreas com aplicações medicinais, cosméticas e alimentares, também vindo a comprovar-se a sua atividade antimicrobiana (Cavanagh e Wilkinson, 2005). *L. luisieri* subsp. é uma das cinco espécies espontâneas do género *Lavandula* que ocorrem em Portugal (Figura 2). É nativa da Península Ibérica, sendo muito comum nas regiões semi-áridas do Sudeste de Portugal e no Sudoeste de Espanha (Zuzarte *et al.*, 2012).



Figura 2 - *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri* (Delgado, 2010).

A utilização antimicrobiana do óleo essencial obtido de *Lavandula* é já conhecida desde a 1ª Guerra Mundial devido ao seu efeito antibacteriano (Cavanagh e Wilkinson, 2005), seguindo-se posteriormente estudos sobre o seu efeito inseticida em pragas agrícolas (Delgado *et al.*, 2007).

O óleo essencial de rosmaninho é produzido usualmente por destilação por vapor, a partir das flores ou folhas. A composição química difere muito, com o óleo das flores a ser o mais aromático e doce. Tradicionalmente o óleo de rosmaninho é antibacteriano, antifúngico, carminativo (relaxamento do musculo liso), sedativo, antidepressivo e eficaz contra queimaduras e picadas de mosquito, porém muitas das atividades atribuídas aos óleos de rosmaninho, ainda não estão confirmadas na literatura científica (Cavanagh e Wilkinson, 2005).

Os óleos essenciais das espécies de *Lavandula* são economicamente importantes, uma vez que são os mais utilizados na indústria (González-Coloma *et al.*, 2011). Muitos estudos foram publicados sobre a composição química do óleo essencial de *L. stoechas* subsp. *luisieri*, mas muito poucos reportam os estudos do óleo essencial desta espécie. De acordo com Delgado (2010) os principais componentes resultantes da análise dos óleos essenciais desta planta

são: acetatos de necrodol, fenchona, necrodol, 5-metilen-2,3,4,4-tetrameticiclopent-2-enona, linalol, isómero acetato de necrodol, cânfora, acetato de linalilo e 1,8-cineol.

Em relação à sua atividade antimicrobiana, o óleo essencial e o extrato de *L. stoechas* subsp. *luisieri* mostraram ter atividades similares, que são significativamente boas contra *Candida albicans* e bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus pyogenes* (González-Coloma *et al.*, 2011).

1.3. *Melaleuca armillaris*

A espécie *Melaleuca armillaris* (Sol. Ex Garertn) Sm pertence à família *Myrtaceae* e ocorre predominantemente na Austrália. As folhas e os caules de várias espécies de *Melaleuca armillaris* produzem óleo essencial de forte aroma e de uso medicinal (Silva, 2007). *Melaleuca* é conhecida popularmente por escovilhão e limpa-garrafas (Figura 3).



Figura 3 -*Melaleuca armillaris* cultivada na Escola Superior Agrária de Castelo Branco.

Em Portugal esta é uma planta exótica cultivada como ornamental em parques e jardins, em especial nas zonas do litoral devido à sua resistência aos ventos marítimos. Segundo Silva (2007) esta espécie é um arbusto que aceita bem as condições de seca e que ocorre em solos rochosos e esqueléticos, com pouca capacidade de retenção de humidade.

As folhas e caules de várias espécies de *Melaleuca* produzem óleo essencial de forte aroma e de uso medicinal. Os metabolitos secundários exprimem-se como resultado de estímulos e integram-se com os sistemas reprodutores adequados. Isto sugere que um organismo pode produzir padrões completamente diferentes de metabolitos dependendo das condições ambientais, duração e intensidade de *stress*, composição e plasticidade genética das plantas (Silva, 2007).

De acordo com Pires (2013) os óleos essenciais revelaram a presença de 1,8-cineol como o seu principal componente.

1.4. *Origanum vulgare* subsp. *virens*

A espécie *Origanum vulgare* (Hoffmanns & Linsk) Bonnier & Layens, pertence à família *Lamiaceae*, é conhecida popularmente por ourégão, orégão ou por manjerona-brava (Figura 4). Esta espécie tem origem no Médio Oriente, e foi introduzida na Europa no século XVI. Cresce naturalmente em quase todas as regiões de Portugal, especialmente nas bordas dos campos, em áreas secas e incultas ou em terrenos abandonados (Castilho *et al.*, 2012).



Figura 4 - *Origanum vulgare* subs. *virens* (Miguel Porto, 2014).

A análise química do óleo essencial de orégão revelou a presença de vários componentes, a maioria dos quais possui importantes propriedades antioxidantes e antimicrobianas. O carvacrol e o timol, são os dois principais fenóis que constituem cerca de 78%-85% do óleo essencial de orégão e são os principais responsáveis pela atividade antimicrobiana. Além disso, outros constituintes menores, como os hidrocarbonetos monoterpênicos, γ -terpineno e p-cimeno, também contribuem para a atividade antibacteriana do óleo. Na literatura, há muitos relatos relacionando a composição química e as propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais de várias espécies de orégão e a sua aplicação em várias preparações comerciais, como antimicrobianos e antioxidantes (Fournomiti *et al.*, 2015). Os óleos voláteis de *Origanum vulgare* apresentam atividade anti-inflamatória, antiespasmódica, antibacteriana, diaforética, antioxidante, antifúngica, analgésica e carminativa (Khan *et al.*, 2011).

Origanum vulgare é aplicado em sistemas de medicina tradicional em muitos países. Tem sido amplamente utilizado nas indústrias agrícola, farmacêutica, alimentar, perfumaria e cosmética. Um estudo realizado, comprova que este óleo essencial demonstrou uma intensa atividade contra *Aspergillus*, revelando assim a sua possível aplicação como antifúngico na conservação de alimentos (Oliveira, 2015).

1.5. *Rosmarinus officinalis* L.

Rosmarinus officinalis L., pertence à família *Lamiaceae*, tem origem na região mediterrânica e é cultivada em quase todos os países de clima temperado, como Portugal, tendo sido usada ao longo dos anos pelas suas qualidades aromáticas e medicinais (WHO,

2009; Begum et al., 2013). *Rosmarinus officinalis* é conhecida popularmente por alecrim (Figura 5).



Figura 5 - *Rosmarinus officinalis* (Cristina Estima Ramalho, 2014).

O alecrim tem sido amplamente utilizado na medicina tradicional e na cosmética. Também é usado como agente aromatizante em alimentos. De acordo com Hussain *et al.* (2010), o óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* é importante pelos seus usos medicinais e pelas suas poderosas propriedades antibacterianas, citotóxicas, antimutagénicas e antioxidantes.

As atividades biológicas dos óleos essenciais e dos extratos estão correlacionadas com a presença de compostos químicos específicos. As condições ecológicas de diferentes países podem influenciar o perfil químico dos materiais vegetais, pois alguns compostos podem ser acumulados em um período específico em resposta às condições ambientais (Hussain *et al.*, 2010).

A composição volátil do óleo essencial de alecrim tem sido objeto de considerável pesquisa nos últimos anos. O óleo essencial de alecrim contém principalmente monoterpenos e derivados de monoterpenos (95-98%), sendo os restantes (2-5%) sesquiterpenos. Os principais componentes voláteis no alecrim são cânfora e 1,8-cineol, seguidos por borneol, verbenona, α -pineno e canfeno (Szumny *et al.*, 2010).

1.6. *Thymus mastichina* L. subsp. *mastichina*

Thymus mastichina L. subsp. *mastichina* (L) L, pertence ao género *Thymus* e à família *Lamiaceae*. É uma planta frequentemente encontrada na Península Ibérica e vulgarmente conhecida por tomilho bela-luz, sal-puro, manjerona-brava (Figura 6), sendo frequentemente usada como condimento e erva medicinal (Carvalho, 2012). Em Portugal encontra-se distribuída de norte a sul do país.



Figura 6 - *Thymus mastichina* (Ana Júlia Perfira, 2014).

Os óleos essenciais da família Lamiaceae são reconhecidos pelas suas propriedades antitússicas, antissépticas, antiespasmódicas, digestivas, estimulantes, rubefacientes e antioxidantes. Sendo muitas vezes utilizados como constituintes ativos e/ou como aromatizantes em alguns medicamentos especializados. Apresentam grupos funcionais com atividade contra variados vírus, bactérias e fungos. Com maior especificidade, o óleo de *Thymus mastichina* é constituído por uma grande variedade de componentes, sendo, no caso dos óleos em estudo, o 1,8-cineol o constituinte que se encontra em maior concentração. Este componente, por existir em maior quantidade, é citado como um dos compostos responsáveis pela bioatividade do óleo essencial, mais precisamente, pela atividade antioxidante, antibacteriana e antifúngica, demonstrada e comprovada em vários estudos. O 1,8-cineol é, de entre os constituintes do óleo essencial de *Thymus mastichina*, o mais estudado, tendo sido realizadas substituições no seu anel aromático, na tentativa de aumentar a sua atividade antifúngica. Também foi demonstrada a sua atividade antiinflamatória, quer a nível sistémico quer a nível tópico (Carvalho, 2012).

Thymus mastichina tem propriedades aromáticas e condimentares e em jardins atrai insetos úteis.

1.7. *Thymus vulgaris*

Thymus vulgaris L. pertence à família *Lamiaceae* e é conhecida vulgarmente por tomilho (Figura 7). É natural da região do Mediterrâneo e também da Ásia, sendo hoje em dia cultivado em quase todos os continentes. É principalmente encontrada em regiões secas, áridas, expostas ao sol, com solos arenosos e calcários enriquecidos com matéria orgânica (Cunha *et al.*, 2009).



Figura 7 - *Thymus vulgaris* (Jardim UTAD Botânico, 2017).

O óleo essencial desta planta é responsável pelo aroma típico das suas folhas e está armazenado nos tricomas das mesmas. Estudos realizados sobre a composição química do óleo desta espécie revelaram que o mesmo é produzido em maiores quantidades na época de floração. O timol é o composto maioritário da sua composição química, seguido pelo carvacrol, o *p*-cimeno e o γ -terpineno. Esta espécie também contém geraniol, linalol, α -terpineol, 1,8-cineol, cimol, borneol, cineno e pineno. Esta espécie é conhecida por ser rica em polifenóis como o ácido cafeico e o ácido rosmarínico, flavonas como a apigenina, luteolina, luteolina-7-O- β -glucuronida, luteolina-7-O- β -glucosilada, 6-hidroxi-luteolina-glicosilada e polimetoxiflavonas. As folhas do tomilho são uma excelente fonte de muitos tipos de vitaminas incluindo a vitamina A, β -caroteno, vitaminas do complexo B, vitamina C, E e K (Cunha *et al.*, 2009).

O óleo de tomilho está entre os 10 principais óleos essenciais usados no mundo, que também são utilizados como conservantes para alimentos. O tomilho é uma das plantas aromáticas mais utilizadas na indústria alimentar (Gavahian *et al.*, 2012). As espécies do género *Thymus* são commumente usadas como infusões, agentes aromatizantes e para fins medicinais (Damjanović-Vratnica *et al.*, 2015).

2. Óleos essenciais e extratos aquosos de plantas aromáticas

O uso de óleos essenciais é comum desde as primeiras civilizações, primeiro no Oriente e Oriente Médio, depois no norte da África e na Europa (Macwan *et al.*, 2016). O termo "óleo essencial" foi criado no século XVI pelo reformador suíço da medicina, Paracelsus Von Hohenheim. A destilação como método de produção de óleos essenciais foi utilizada pela primeira vez no Oriente (Egito, Índia e Pérsia) há mais de 2000 anos e foi aperfeiçoada no século IX pelos árabes. A primeira escrita autenticada da destilação do óleo essencial é atribuída a Villanova, um médico catalão no século XIII (Burt, 2004). Os óleos essenciais são definidos como "o produto obtido a partir de matérias-primas vegetais, quer por destilação com água ou vapor, quer pelo epicarpo de citrinos, por um processo mecânico ou por destilação a seco" (ISO / DIS 92:35, 2013).

Os óleos essenciais são metabolitos secundários das plantas aromáticas, naturais e voláteis, normalmente com forte odor. São líquidos, límpidos, quase nunca coloridos e solúveis em solventes orgânicos com uma densidade geralmente mais baixa do que a da água

(Bakkali *et al.*, 2008). Estes compostos produzidos pelas plantas podem ser sintetizados por todos os seus órgãos desde flores, folhas, caules, sementes, frutos, raízes e são armazenados em células secretoras, cavidades, canais, células epidérmicas ou tricomas glandulares (Bakkali *et al.*, 2008). Os óleos obtidos podem variar em quantidade, qualidade e, normalmente, na composição de acordo com o clima, composição do solo, órgão da planta, idade e fase do ciclo vegetativo (Angioni *et al.*, 2006).

Na natureza, os óleos essenciais desempenham um papel importante na proteção das plantas como antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas e também contra herbívoros, reduzindo o seu apetite por tais plantas. Eles também podem atrair alguns insetos para favorecer a dispersão do pólen e das sementes, ou repelir outros indesejáveis.

Os processos de extração dos óleos essenciais são a hidrodestilação (Figura 8), a destilação a vapor, a expressão e a extração com fluídos supercríticos. Os diferentes métodos têm impacto não só no rendimento do processo, mas também na composição do óleo essencial, nomeadamente a concentração obtida para cada composto extraído e o seu grau de pureza. O processo de extração de óleos essenciais mais comum na indústria é a destilação a vapor. Nesta técnica, a extração dos compostos voláteis é realizada por arrastamento pelo vapor de água, seguida de passagem do vapor por um condensador, o que origina a sua transformação em líquido, que em recipiente “tipo florentino”, por ação da gravidade, separa a fase aquosa do óleo essencial. O destilado é assim constituído por óleo essencial e por água aromatizada (hidrolato da planta), pois há sempre uma pequena percentagem de composto do óleo essencial que nela se dissolve. A parte da planta a partir da qual se pretendem extrair os óleos pode ser misturada com água, sendo aquecida de modo a que o vapor produzido, após passagem pelo condensador, origine o óleo essencial (Cunha *et al.*, 2009).

Este processo foi desenvolvido na idade média pelos árabes (Bakkali *et al.*, 2008) e é um bom método de extração, uma vez que resulta num favorável rendimento e recuperação de todos os elementos essenciais dos constituintes do óleo essencial e do extrato aquoso (Southwell e Lowe, 2006).

Estas substâncias necessitam de condições exigentes de armazenamento, incluindo a utilização de reservatórios herméticos e evitando a exposição à luz, devido à sua alta volatilidade e fotosensibilidade (Lang e Buchbauer, 2011).



Figura 8- Representação esquemática da técnica de extração por hidrodestilação (Samadi *et al.*, 2016).

Os óleos essenciais exibem uma grande atividade antimicrobiana e características hidrofóbicas. Devido à hidrofobicidade dos compostos dos óleos essenciais, eles passam facilmente através da membrana celular bacteriana, interferindo nos mecanismos de transporte molecular que levam à inativação celular. Os óleos essenciais exibem comumente maior atividade inibitória contra bactérias Gram-positivas do que contra bactérias Gram-negativas devido à natureza lipopolissacarídica da membrana externa da parede celular das bactérias Gram-negativas (Khorshidian *et al.*, 2018).

Os óleos essenciais podem incluir mais de 60 componentes individuais (Senatore, 1996; Russo *et al.*, 1998). Os principais componentes podem constituir até 85% de um óleo essencial e geralmente definem as suas propriedades biológicas. No entanto, os outros 15% são formados por componentes menores que, embora presentes em níveis inferiores, muitas vezes nos limites de detecção, têm um papel significativo nas atividades biológicas, atuando em sinergia com os principais compostos (Burt, 2004). Um efeito de sinergismo ocorre quando o efeito das substâncias combinadas é maior do que a soma dos efeitos individuais (Burt, 2004).

Os óleos essenciais são caracterizados quimicamente como misturas complexas de compostos voláteis (Martins *et al.*, 2011), não se misturam com água e podem ser extraídos por diferentes processos, como sejam a hidrodestilação, destilação a vapor, CO₂ supercrítico, utilizando solventes orgânicos ou gorduras (Probst e Junior, 2012).

Atualmente, a utilização de extratos já é bastante utilizada na indústria alimentar, farmacêutica e cosmética. Estes podem ser obtidos através de solventes químicos, orgânicos e aquosos como por exemplo o benzeno, o clorofórmio, o éter sulfúrico, o metanol, o etanol e a água. A metodologia usada na preparação dos extratos, o solvente usado, assim como o tratamento do produto/planta (inteira ou reduzida em pó) influenciam a extração de compostos antioxidantes. Contudo, não há nenhum solvente que seja totalmente satisfatório para a extração de todos os antioxidantes presentes no produto/planta, nomeadamente aqueles que estão associados a hidratos de carbono complexos (Pérez-Jiménez *et al.*, 2008). Segundo Singh *et al.* (2006) os extratos obtidos com diferentes solventes apresentam capacidades antimicrobianas diferentes.

A extração é um passo importante na identificação, separação e utilização de compostos bioativos. A extração de compostos naturais a partir de material vegetal é realizada

regularmente por hidrodestilação ou através de solventes orgânicos. No entanto, a extração com solventes orgânicos poderá ter alguns inconvenientes, no que respeita à toxicidade de alguns solventes utilizados que podem inviabilizar a sua utilização no domínio alimentar (Coelho, 2015).

3. Avaliação da atividade antimicrobiana

Uma variedade de métodos laboratoriais pode ser usada para avaliar ou investigar a atividade antimicrobiana *in vitro* de um extrato ou de um composto puro. Os métodos mais conhecidos e básicos são o método de difusão em disco, difusão em agar e diluição em caldo para determinação da concentração mínima inibitória (MIC) (Balouiri *et al.*, 2016).

Em relação ao método de difusão em disco, na maioria dos estudos os halos de inibição são comparados aos dos antibióticos, no entanto é importante levar em consideração a particularidade dos óleos, o meio de cultura utilizado e o microrganismo teste (Bona *et al.*, 2014).

Geralmente são utilizadas as normas CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), anteriormente denominadas normas NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Ainda há poucos estudos comparativos referindo qual é o melhor método a ser utilizado para avaliar a atividade antimicrobiana, mesmo no que se refere às metodologias usualmente utilizadas. Além disso, há necessidade da uniformização dos métodos de extração e testes *in vitro*, para que a pesquisa possa ser conclusiva (Bona *et al.*, 2014).

O resultado de um teste pode ser afetado por fatores como o método utilizado para extrair o óleo essencial do material vegetal, o volume de inóculo, a fase de crescimento da cultura microbiana, a constituição e pH do meio de cultura e o tempo e temperatura de incubação (Burt, 2004).

A concentração mínima inibitória (MIC) é citada pela maioria dos pesquisadores como uma medida do desempenho antimicrobiano dos óleos essenciais. A definição do MIC difere entre as publicações e isso é outro obstáculo à comparação de resultados entre os diferentes estudos. Em alguns casos é indicada a concentração mínima bactericida (MBC) a qual é definida como a concentração mínima do agente bacteriano que mata 99,9% dos microrganismos inicialmente presentes (Burt, 2004). Uma lista dos termos mais frequentemente utilizados nos testes de atividades antimicrobianas está apresentada na Tabela 1 (Burt, 2004).

Tabela 1 - Termos utilizados nos testes da atividade antimicrobiana (Adaptado de Burt, 2004).

Termo utilizado	Definição, com referência à concentração do óleo essencial
Concentração mínima inibitória (MIC)	<ul style="list-style-type: none">- Concentração mais baixa que resulta na manutenção ou redução do inóculo;- Concentração mais baixa necessária para inibição completa do microrganismo em estudo em 48h de incubação;- Concentração mais baixa que inibe o crescimento visível do microrganismo em estudo;- Concentração mais baixa que resulta numa diminuição significativa da viabilidade do inóculo (> 90%).
Concentração mínima bactericida (MBC)	<ul style="list-style-type: none">- Concentração correspondente a 99,9% ou mais de morte celular;- Concentração mais baixa na qual não se observa crescimento após subcultura no meio líquido fresco.
Concentração bacteriostática	<ul style="list-style-type: none">- Concentração mais baixa na qual as bactérias não crescem em meio líquido mas têm a capacidade de crescer quando são cultivadas para meio sólido.
Concentração bactericida	<ul style="list-style-type: none">- Concentração mais baixa à qual as bactérias não crescem em meio líquido e não têm a capacidade de crescer quando são transferidas para meio sólido.

O método mais frequentemente usado para efetuar a avaliação prévia da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais é designado de método de difusão em placa ou método dos discos. Este método consiste em colocar um disco de papel de filtro estéril embebido no óleo essencial sobre uma placa de meio de cultura sólido previamente inoculado com a cultura em estudo. Fatores tais como o volume do óleo essencial colocado sobre os discos de papel, a espessura da camada de meio e a utilização ou não de um solvente variam consideravelmente entre os estudos. Isso significa que este método é útil para a seleção entre óleos essenciais, mas a comparação de dados publicados não é viável. Outro método igualmente usado consiste em depositar o óleo essencial em poços cortados no meio de cultura (Burt, 2004).

A força da atividade antibacteriana pode ser determinada por diluição do óleo essencial em meio sólido ou líquido. Os estudos publicados utilizando a diluição em meio sólido usaram diferentes solventes para incorporar o óleo essencial no meio e diferentes volumes de inóculo (1-100 µL). Apesar destas variações, os valores de óleos essenciais determinados por diluição em meio sólido geralmente parecem estar aproximadamente na mesma ordem de grandeza. Nos estudos de diluição em meio líquido existem várias técnicas diferentes para determinar a concentração mínima inibitória. Os métodos mais utilizados são os da medição da densidade ótica (OD) e a contagem das colónias para determinar o número de células viáveis.

Uma característica dos métodos de ensaio que varia consideravelmente é se um emulsionante ou solvente é utilizado para dissolver o óleo essencial ou estabilizá-lo em meios de cultura à base de água. Várias substâncias são utilizadas para este fim como o etanol, metanol, tween 20, tween 80 e acetona em combinação com tween 80, entre outros (Burt, 2004).

4. Modo de ação antimicrobiana

Embora as propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais e dos seus componentes tenham sido verificadas no passado, em muitos casos o mecanismo da sua ação não é estudado em detalhe. Considerando um grande número de diferentes grupos de compostos

químicos presentes nos óleos essenciais, é mais provável que a sua atividade antibacteriana não seja atribuída a um mecanismo específico, mas sim a vários alvos na célula. Os locais ou mecanismos na célula bacteriana que se acredita serem locais de ação para os compostos de óleos essenciais são indicados na Figura 9. Nem todos esses mecanismos são alvos separados mas sim de forma sequencial e por interação com outros mecanismos (Burt, 2004).

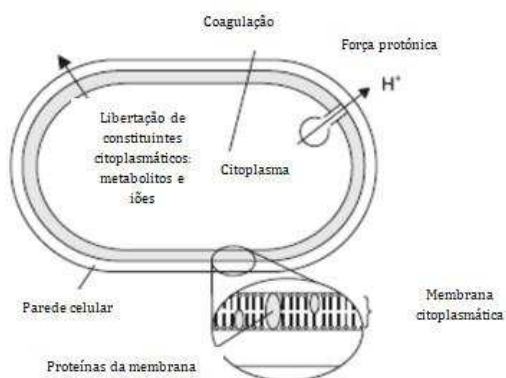


Figura 9 - Locais e mecanismos de ação antimicrobiana dos componentes dos óleos essenciais: degradação da parede celular; dano da membrana citoplasmática; dano das proteínas membranares; perda de componentes celulares; coagulação do citoplasma e diminuição da força protônica (Adaptado de Burt, 2004).

Uma característica importante dos óleos essenciais e dos seus compostos é a sua hidrofobicidade, a qual permite que eles se misturem nos lipídios da membrana citoplasmática bacteriana e da membrana das mitocôndrias dos microrganismos eucariontes, alterando a sua permeabilidade seletiva, o que pode levar à saída de íons e outros conteúdos celulares. Se em pequena escala, esta saída de conteúdo celular pode ser tolerada sem perda de viabilidade, no entanto, a extensa perda de conteúdo celular ou a saída de moléculas e íons críticos levará à morte celular (Burt, 2004).

Geralmente, os óleos essenciais que possuem propriedades antibacterianas mais fortes contra microrganismos patogênicos de origem alimentar contêm uma alta percentagem de compostos fenólicos, como carvacrol, eugenol (2-metoxi-4-(2-propenil) fenol) e timol. Parece razoável pensar que o seu mecanismo de ação seja, portanto, semelhante a outros compostos fenólicos, o que é geralmente considerado como sendo a perturbação da membrana citoplasmática, interrompendo a força protônica, o fluxo de elétrons, o transporte ativo e a coagulação do conteúdo celular (Burt, 2004).

Componentes de óleos essenciais também parecem agir sobre as proteínas incorporadas na membrana citoplasmática. Enzimas como a ATPase são conhecidas por estarem localizadas na membrana citoplasmática e serem delimitadas por moléculas lipídicas. Dois possíveis mecanismos foram sugeridos por meio dos quais hidrocarbonetos cíclicos poderiam atuar sobre estes. Moléculas de hidrocarbonetos lipofílicos podem acumular-se na bicamada lipídica e distorcer a interação lípido-proteína. Alternativamente, também é possível a interação direta dos compostos lipofílicos com partes hidrofóbicas da proteína. Descobriu-se que alguns óleos essenciais estimulam a formação de pseudomicélios em certas leveduras. Isso poderia ser uma indicação de que os óleos essenciais atuam nas enzimas envolvidas na regulação da energia ou na síntese de componentes estruturais (Burt, 2004).

Componentes de óleos essenciais com poder antimicrobiano e modo de ação

Carvacrol e timol

O carvacrol e o timol são componentes que pertencem à classe dos terpenos, mais especificamente ao grupo dos monoterpenos e podem ser encontrados em diversas plantas aromáticas. Estruturalmente o timol é muito semelhante ao carvacrol, diferindo o grupo hidroxilo num local diferente no anel fenólico. Assim sendo, o modo de ação de ambos é semelhante atuando na membrana celular tornando-a permeável (Burt, 2004). Estes dois componentes têm a capacidade de desintegrar a membrana externa das bactérias Gram-negativas, libertando os lipopolissacáridos (LPS) e aumenta a permeabilidade da membrana citoplasmática ao ATP. A presença de cloreto de magnésio não mostrou ter influência sobre esta ação, sugerindo um mecanismo diferente da quelação de cátions na membrana externa (Burt, 2004).

Diversos estudos demonstram a forte capacidade antimicrobiana do carvacrol e do timol, sendo dois dos principais componentes dos óleos de orégão e tomilho (Juven *et al.*, 1994, Sivropoulou *et al.*, 1996; Burt, 2004). Segundo Juven *et al.* (1994), foi verificada a ação do timol contra *Salmonella typhimurium* e *Staphylococcus aureus*. A atividade antimicrobiana do carvacrol também foi demonstrada contra *Pseudomonas fluorescens* (Afra *et al.*, 2006).

Cariofileno

Cariofileno é um sesquiterpeno bícíclico natural com um anel de ciclobutano. Este é conhecido pelo seu efeito anti-inflamatório e pelas suas atividades anestésicas locais. Tem sido relatado como um composto volátil produzido por plantas em resposta ao ataque de herbívoros e/ou devido a fatores abióticos. Sabual *et al.* (2006) demonstraram que o óleo de rizoma de *Zingiber nimmonii* apresentou uma composição de 69,9% de cariofileno isomérico, β -cariofileno (42,2%) e α -cariofileno (27,7%), revelando atividade antifúngica significativa contra fungos patogênicos para humanos (*Candida glabrata*, *Candida albicans* e *Aspergillus niger*), mas sem atividade contra o fungo fitopatogénico *Fusarium oxysporum*. Foi demonstrada a atividade antibacteriana contra *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas aeruginosa*.

γ -Terpineno

γ -Terpineno pertence à classe dos monoterpenos, sendo conhecido pelas suas propriedades antioxidantes. Segundo Aridogan *et al.* (2002) verificou-se a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Origanum onites*, sendo o γ -terpineno um dos componentes marioritários. Este componente em conjugação com o 1,8-cineol não revelaram atividade antimicrobiana. Por outro lado, foi demonstrada a forte capacidade antioxidante revelada pelo γ -terpineno, incluindo a capacidade de retardar a oxidação do LDL (Milde *et al.*, 2004).

5. Características dos microrganismos usados neste estudo

5.1. *Achromobacter xylosoxidans*

A taxonomia do género *Alcaligenes* passou por várias mudanças nos últimos 20 anos. A espécie *Achromobacter* (*Alcaligenes*) *xylosoxidans* foi consecutivamente denominada *Achromobacter xylosoxidans*, *Alcaligenes denitrificans* subsp. *xylosoxidans* e *Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans*. Mais recentemente, o nome *Achromobacter xylosoxidans* foi novamente proposto (Liu *et al.*, 2002). *Achromobacter xylosoxidans* é um bacilo Gram-negativo móvel, não fermentador, oxidase e catalase positiva, que pode ser encontrado amplamente distribuído em ambientes naturais, mais frequentemente em ambientes húmidos. Também pode ser isolado de plantas onde apresenta características endofíticas e promotoras de crescimento. A tolerância adicional a compostos aromáticos e metais pesados torna este microrganismo um candidato a bio-inoculante eficaz para plantas em fitorremediação e como uma ferramenta de biorremediação para solos contaminados. No entanto, além de alguns genes para essas vias de degradação, no seu genoma também existem genes associados à patogenicidade, à produção de toxinas e à resistência a antibióticos. Assim, além do seu papel como organismo ambiental, *Achromobacter xylosoxidans* tem sido reconhecido nos últimos anos como um microrganismo patogénico nosocomial emergente (Wittmann *et al.*, 2014).

5.2. *Alcaligenes faecalis*

Alcaligenes faecalis é um bacilo Gram-negativo aeróbico não fermentativo, positivo para a oxidase e não encapsulado. É assim chamada devido à sua capacidade de produzir uma reação alcalina em certos meios. *Alcaligenes faecalis* é o membro mais frequentemente isolado da família *Alcaligenaceae* em laboratórios de análises clínicas. Está presente no solo e na água, bem como na flora intestinal humana e nos ambientes hospitalares (Tena *et al.*, 2015). Embora possam ser agentes de infeções, esta bactéria é geralmente considerada não patogénica.

5.3. *Pseudomonas*

O género *Pseudomonas* pertence à família *Pseudomonadaceae* e é considerado o grupo mais heterogéneo e ecologicamente significativo de bactérias conhecidas. São bacilos aeróbios, Gram-negativos, não esporulados, incapazes de fermentar a glucose e quimiorganotróficos. Apresentam uma elevada versatilidade metabólica graças à presença de um complexo sistema enzimático. As exigências nutricionais de *Pseudomonas* spp. são muito simples e o género é encontrado numa grande diversidade de habitats naturais como o solo, água doce, ambientes marinhos, entre outros. Também tem sido isolado de instrumentos clínicos, soluções assépticas, cosméticos e produtos médicos. Clinicamente algumas espécies são consideradas microrganismos patogénicos oportunistas para humanos e animais enquanto outros, como os fitopatogénicos, são responsáveis por perdas no setor agrícola (Franzetti e Scarpellini, 2007).

Uma vez que a taxonomia bacteriana é uma ciência recente e dinâmica, é frequente a reclassificação de espécies dentro do grupo *Pseudomonas*, assim como se tem verificado um aumento cada vez maior no número de espécies que compreendem este género (Peix *et al.*, 2009). De acordo com Peix *et al.* (2018), desde 2009 foram descritas mais de 70 novas espécies de *Pseudomonas*, com uma média anual de 10 novas espécies nos últimos três anos.

O género *Pseudomonas* é considerado um importante microrganismo de alteração de géneros alimentícios, em particular do leite e seus derivados (Stellato *et al.*, 2017). No caso da presença de *Pseudomonas* em queijos, a sua origem pode estar associada ao leite cru, à água usada na higienização e ao ambiente das queijarias (incluindo aqui o ar e todas as superfícies que contactam quer com o leite antes de ser processado quer com o queijo, em todas as fases de maturação) (Ferreira, 2017).

Pseudomonas fluorescens e *Pseudomonas putida* são duas importantes espécies de *Pseudomonas* que podem encontrar-se presentes no leite cru, podendo multiplicar-se neste mesmo em condições de conservação a temperaturas de refrigeração, dado serem bactérias psicotróficas. Estas bactérias produzem lípase e proteases, as quais são termolábeis e podem comprometer a qualidade dos queijos produzidos.

Uma importante característica do género *Pseudomonas* é a sua capacidade para produzir pigmentos, os quais alteram a cor da superfície dos queijos, o que constitui um defeito que deprecia a qualidade e o valor económico deste produto. Os pigmentos produzidos podem ser fluorescentes (pioverdina e derivados de pteridinas) ou não fluorescentes (piocianina e pigmentos insolúveis do tipo carotenóides). O pigmento piocianina (pigmento azul esverdeado hidrossolúvel) pode ser produzido por *P. aeruginosa* e por *P. fluorescens*, sendo no entanto a produção deste pigmento uma característica mais significativa de *P. aeruginosa* (El-Fouly *et al.*, 2015). O pigmento pioverdina é um fluorescente amarelado solúvel em água cuja produção por *P. fluorescens* ocorre em situações particulares como é o caso de meios com carência de ferro. Ao juntar os pigmentos piocianina e pioverdina é originado um pigmento de cor verde brilhante, o qual é característico de *P. aeruginosa*. Esta bactéria, para além de todos os pigmentos referidos, também pode produzir outros pigmentos hidrossolúveis, como é o caso de piorrubina (pigmento vermelho) e de piomelanina (pigmento castanho a negro).

6. Revestimentos edíveis

A utilização de revestimentos e filmes biodegradáveis, bem como de outros produtos biodegradáveis, têm o objetivo de substituir produtos sintéticos já existentes, a custo baixo.

Diversos materiais têm sido usados para a produção de revestimentos edíveis, nomeadamente, as proteínas, os polissacáridos e os lípidos. Entre estes, as proteínas de soro de leite são as que se destacam mais na sua utilização. Com a adição do plastificante e a desnaturação da solução de proteínas de soro, obtêm-se filmes transparentes e flexíveis com excelentes propriedades de barreira (para o oxigénio, aromas e lípidos), a baixos valores de humidade relativa. A natureza hidrofílica dos filmes de isolado proteico de soro de leite (WPI) é responsável pela baixa eficácia como barreira para o vapor de água. Esta propriedade pode ser melhorada com a incorporação de lípidos (Pérez-Grego e Krochta, 2002).

O quitosano, ou poli (1-4) -2-amido-2-desoxi- β -D-glucose (Figura 10), é um biopolímero linear, do tipo polissacárido, obtido a partir da desacetilação da quitina que, a seguir à celulose, é o segundo polissacárido mais abundante na natureza (Aider, 2010), estando naturalmente presente no exoesqueleto de crustáceos, nas paredes celulares de fungos e em outros materiais biológicos (Homez-jara *et al.*, 2018).

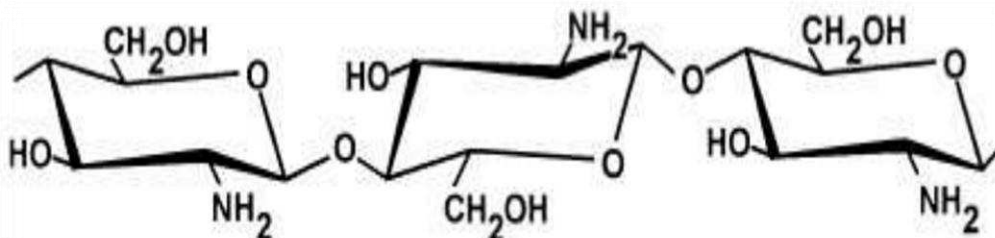


Figura 10 - Estrutura molecular do quitosano (Shahidi *et al.*, 1999).

Essencialmente, o quitosano apresenta três tipos de grupos funcionais, um grupo amina e dois grupos hidroxilo primário e secundário, que estão respetivamente na posição C-2, C-3 e C-6 (Shahidi *et al.*, 1999). Estes grupos funcionais, na presença de soluções ácidas vão adquirir carga positiva, possibilitando a existência de reações químicas, pelo que pode apresentar propriedades diversas.

O quitosano é um biopolímero biodegradável, biocompatível, biofuncional e não apresenta toxicidade para os humanos. Possui propriedades antibacterianas provavelmente resultantes das interações entre as suas moléculas catiónicas com as cargas negativas presentes à superfície das células bacterianas. O aproveitamento deste polímero tem também demonstrado uma importância ambiental. Os resíduos dos crustáceos são abundantes e rejeitados pela pesca industrial e o seu aproveitamento reduz o impacto ambiental causado pela sua acumulação (Shahidi *et al.*, 1999).

A distinta capacidade do quitosano formar revestimentos torna este polímero num bom constituinte para a formulação de revestimentos edíveis, capazes de prolongar a vida útil dos produtos alimentares. Apresentam uma permeabilidade seletiva aos gases CO_2 e O_2 e ao vapor de água, assim como boas propriedades mecânicas. Apesar destas últimas, podem originar películas demasiado rígidas e com elevada permeabilidade ao vapor de água. De forma a melhorar todas estas propriedades indesejáveis, é possível adicionar outros compostos como plastificantes, para tornar o revestimento mais maleável, ou lípidos e tensoativos, para aumentar a barreira ao vapor de água (Vargas *et al.*, 2009).

III. Material e Métodos

1. Extração dos óleos essenciais

1.1. Recolha do material vegetal

Para o presente estudo utilizámos óleos essenciais e extratos aquosos das espécies *Cymbopogon citratus*, *Lavandula luisieri*, *Melaleuca armillaris*, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris*, *Thymus mastichina* e *Origanum vulgare*. A maioria destas espécies são cultivadas na Escola Superior Agrária de Castelo Branco de onde foram devidamente colhidas, nos meses de Março e Abril de 2017. A espécie *Thymus mastichina* foi fornecida generosamente pelo Instituto Politécnico de Coimbra e a espécie *Lavandula luisieri* foi fornecida pelo Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior, sediado em Castelo Branco.

Para a realização da secagem, as flores e/ou as folhas foram distribuídas em vários tabuleiros em camadas finas e deixadas a secar em prateleiras de um secador durante uma a duas semanas, à temperatura ambiente, baixa humidade relativa e sem luz direta.

Após os primeiros ensaios e tendo em conta os rendimentos em óleo essencial de cada espécie, as espécies de *Origanum vulgare* e de *Cymbopogon citratus*, tiveram que ser adquiridas a produtores portugueses e todo o restante trabalho foi realizado com os óleos essenciais desta proveniência. A empresa fornecedora foi a ERVITAL.

1.2. Obtenção dos óleos essenciais e dos extratos aquosos

Para a realização dos extratos aquosos e dos óleos essenciais fizeram-se três extrações de cada planta estudada usando o método de hidrodestilação através de um aparelho modificado do tipo Clevenger (Figura 11).

Pesou-se aproximadamente 100g de material vegetal seco de cada espécie estudada e transferiu-se para um balão volumétrico de 2000 mL ao qual se adicionou 1000 mL de água destilada. Este foi colocado numa manta de aquecimento como fonte geradora de calor e acoplou-se ao aparelho de Clevenger iniciando a hidrodestilação. A extração foi efetuada no tempo de 2 horas, após o início da condensação da primeira gota de água.

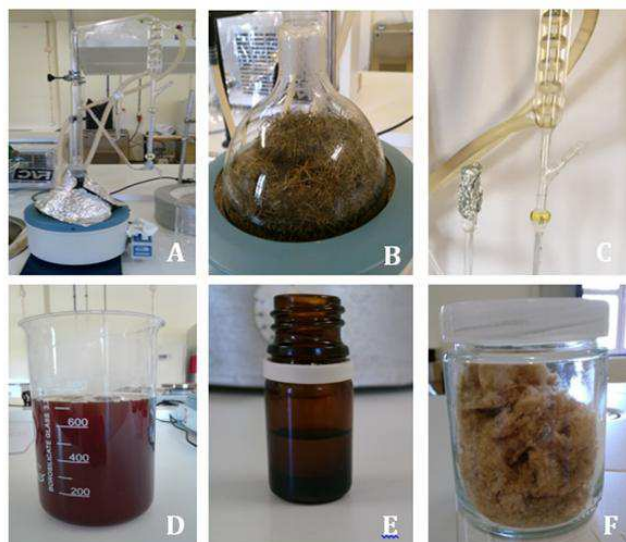


Figura 11 - Processo de hidrodestilação de óleos essenciais. A) Aparelho de Clevenger modificado; B) Balão de fundo redondo acoplado ao aparelho Clevenger modificado; C) Obtenção do óleo essencial; D) Frasco com extrato aquoso; E) Frasco com óleo essencial; F) Frasco com extrato aquoso liofilizado.

Após a hidrodestilação e obtenção dos óleos essenciais, mediu-se o rendimento, em mL, na pipeta milimétrica do aparelho e foram colocados em frascos de vidro âmbar, selados, revestidos com papel de alumínio, para proteção da luz, e mantidos no frio (4°C) até análise química dos compostos e ensaios antimicrobianos.

O rendimento da extração foi calculado com base na seguinte equação:

$$\bullet \text{ Rendimento da extração de óleo (\%)} = \frac{\text{Volume do óleo obtido (mL)}}{\text{Massa do material vegetal (g)}} \times 100$$

Os extratos aquosos das plantas em estudo foram devidamente liofilizados utilizando o equipamento Zirbus VaCo 10 II-D, sendo o sólido armazenado em frascos com cerca de 30 mL e conservados num congelador (-20°C/-80°C) até serem liofilizados.

O rendimento da extração foi calculado com base na seguinte equação:

$$\bullet \text{ Rendimento da extração do extrato aquoso} = \frac{\text{Massa liofilizado (g)}}{\text{Massa seca da amostra (g)}} \times 100$$

Os óleos essenciais e os extratos aquosos foram identificados com diferentes siglas que se encontram na Tabela 2.

Tabela 2 - Nome comum e sigla utilizada na identificação de cada um dos óleos essenciais e extratos aquosos utilizados.

Identificação da espécie	Nome comum/popular	Sigla do óleo Essencial	Sigla do extrato aquoso
<i>Cymbopogon citratus</i>	Erva-príncipe	OEP	EEP
<i>Cymbopogon citratus</i> (ERVITAL)	Erva-príncipe	OEP (E)	EEP (E)
<i>Lavandula luisieri</i>	Rosmaninho	OR	ER
<i>Melaleuca armillaris</i>	Escovilhão	OM	EM
<i>Origanum vulgare</i>	Orégão	OO	EO
<i>Origanum vulgare</i> (ERVITAL)	Orégão	OO (E)	EO (E)
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Alecrim	AO	EA
<i>Thymus mastichina</i>	Tomilho Bela-luz	OTBL	ETBL
<i>Thymus vulgaris</i>	Tomilho	OT	ET

2. Culturas bacterianas usadas

As culturas bacterianas utilizadas no nosso estudo foram previamente isoladas de amostras de leite cru, queijo, zaragatoas ambientais e água, encontrando-se crioconservadas a -80°C no Laboratório de Microbiologia da Escola Superior Agrária de Castelo Branco. Na Tabela 3 consta a proveniência das culturas bacterianas utilizadas neste trabalho.

Tabela 3 - Proveniência das culturas bacterianas testadas neste estudo.

Características particulares		
Referências	Microrganismos	Proveniência
2	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Leite cru de ovelha
7	<i>Alcaligenes faecalis</i>	Leite cru de vaca
9	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	Zaragatoa ao ambiente de uma queijaria
27	<i>Pseudomonas putida</i>	Zaragatoa a manipulador de alimento
29	<i>Pseudomonas putida</i>	Água não tratada
67	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Leite cru de cabra
132	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	Zaragatoa de francela (queijaria)
137	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Zaragatoa do carrinho de inox (queijaria)
153	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Zaragatoa de escova de lavar queijo (queijaria)
184	<i>Pseudomonas putida</i>	Zaragatoa do carrinho de inox 1 (queijaria)
191	<i>Pseudomonas putida</i>	Zaragatoa a casca de queijo de cabra

As onze culturas bacterianas referidas na Tabela 3 foram isoladas no âmbito de trabalhos desenvolvidos ao longo dos últimos cinco anos a partir de amostras de queijo, leite cru, água e zaragatoas a superfícies e ambiente de queijarias e explorações leiteiras, quer no âmbito de trabalhos de fim de curso de licenciatura e de mestrado (Ramos, 2014; Domingues, 2015; Ferreira, 2017; Morais, 2018) quer no âmbito dos trabalhos de rotina a decorrer no Laboratório de Microbiologia. A seleção destas culturas bacterianas foi efetuada tendo em conta a capacidade de produção de pigmentos responsáveis por defeitos de coloração em queijos laborados com leite cru de pequenos ruminantes.

3. Ensaio prévios da atividade antimicrobiana

Para a execução dos testes prévios da atividade antimicrobiana foram realizados ensaios em duplicado através do método de difusão em placa, com e sem disco. Foi utilizado o meio *Mueller Hinton Agar* (OXOID ref^a CM0337), com 0,8% (v/v) de tween 80 (VWR ref^a 28830.291) nas placas utilizadas para os ensaios com os óleos, e sem tween 80 nas placas utilizadas para os ensaios com os extratos. O meio de cultura foi preparado de acordo com as indicações do fabricante e esterilizado em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Após esterilização e arrefecimento a 45°C foi distribuído em placas de Petri.

No método de difusão em placa sem disco foi utilizada uma gota de 5µL de óleo essencial ou de extrato aquoso, diretamente sobre o meio previamente inoculado. No ensaio com disco foi colocada uma gota de 10 µL sobre os discos estéreis de 6 mm de diâmetro (OXOID ref^a CT0998B) colocados sobre as placas após terem sido inoculadas com os microrganismos referidos na Tabela 3.

Foram também realizados ensaios prévios com os extratos aquosos provenientes das mesmas plantas usadas para a obtenção dos óleos essenciais.

4. Método da microdiluição em caldo para determinação da concentração mínima inibitória (MIC)

4.1. Preparação do meio de cultura

Foi utilizado o meio de cultura líquido *Mueller Hinton Broth* (OXOID ref^a CM0405), adicionado de tween 80 na concentração de 0,8% (v/v) nos ensaios com óleos, para emulsionar o óleo no meio, e sem tween 80 nos ensaios com os extratos aquosos. O pH do meio de cultura foi acertado a 6,2. Posteriormente, o meio foi levado a esterilizar a 121°C durante 15 minutos em autoclave.

4.2. Preparação da solução de resazurina

Para a preparação da solução de resazurina a 0,01%, foram adicionadas duas pastilhas de resazurina (BDH ref^a 1520012) a 50 mL de água destilada. A solução após completa dissolução foi esterilizada por filtração utilizando uma membrana filtrante de porosidade 0,22 µm.

4.3. Preparação dos extratos aquosos

Os extratos aquosos foram preparados na concentração de 120 mg/mL. Pesou-se 120 mg de cada extrato e colocou-se num Eppendorf que já continha 1mL de água ultrapura e esterilizada. Os extratos foram congelados a -80°C para o caso de ser necessário reproduzir o trabalho mais tarde.

4.4. Preparação do inóculo

As culturas em estudo, das espécies *Pseudomonas fluorescens* (ref^a 2, 67, 137 e 153), *Alcaligenes faecalis* (ref^a 7), *Pseudomonas putida* (ref^a 27, 29, 184 e 191) e *Achromobacter xylosoxidans* (ref^a 9, 132), encontravam-se criopreservadas a -80°C em caldo de Triptona Soja (TSB) e glicerol a 15% (v/v). Após a descongelação foram repicadas para o meio de cultura adequado, *Plate Count Agar* (PCA). Todas as culturas foram incubadas a 37°C durante 24h. Após o período de incubação foi preparada uma suspensão do inóculo em soro fisiológico a 0,85%, de acordo com o padrão 0,5 da escala de McFarland, que corresponde a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.

Para além da observação da turvação a partir da escala 0,5 de McFarland, foram realizadas diluições dos diferentes inóculos em soro fisiológico e inoculados em meio de PCA para confirmação da densidade celular do inóculo.

4.5. Preparação da microplaca

Todo o procedimento foi executado com material previamente esterilizado e numa câmara de fluxo laminar, de modo a diminuir a possibilidade de contaminações.

Foram utilizadas microplacas (Figura 12) com 96 poços e foram testados nove óleos essenciais e nove extratos aquosos, em duplicado.

As concentrações (% v/v) dos óleos essenciais e dos extratos aquosos testados foram: 8,69; 4,49; 2,324; 1,204; 0,63; 0,33; 0,168; 0,084 e 0,05.

Com o auxílio de uma micropipeta foram adicionados 263 µL de meio de cultura na coluna 1 e 140µL nas colunas 2 a 9. A coluna 10 corresponde ao controlo positivo (CP) que contém somente 140µL de meio e 10µL de inóculo, enquanto a coluna 11 corresponde ao controlo negativo (CN) o qual contém 140µL de meio e 10µL de óleo ou extrato. Na coluna 12 foi apenas adicionado 140µL de meio de cultura (CM).

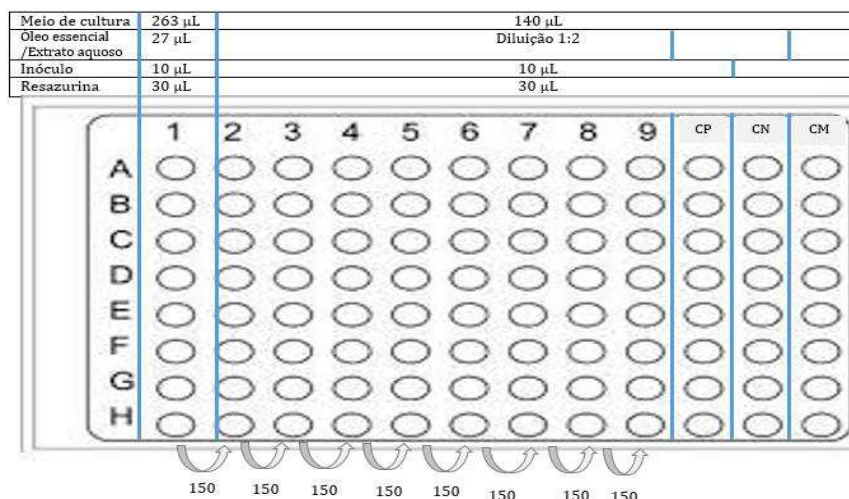


Figura 12 - Esquema do teste de microdiluição em microplaca.

Na primeira coluna foram adicionados 27 μL de óleo essencial/extrato aquoso, para a obtenção, no final, da concentração máxima testada de 8,69% (v/v) de óleo essencial/extrato aquoso.

Foram feitas oito diluições em série de 1:2, ou seja, do poço A1 retiraram-se 150 μL para o poço A2 e assim sucessivamente, utilizando-se a homogeneização por pipetagem entre cada diluição.

Após inoculação (10 μL por poço, à exceção do CN e do CM), as microplacas foram colocadas num agitador de microplacas e colocadas em estufa para incubação durante 24 horas a 30°C, em atmosfera húmida. Após a incubação adicionámos a cada poço 30 μL de solução de resazurina, sendo as microplacas colocadas novamente na placa de agitação antes de se proceder à leitura.

5. Avaliação da concentração mínima bactericida (MBC)

Para a determinação da concentração mínima bactericida dividiram-se as placas de Petri com meio de cultura Agar Nutritivo (Liofilchen ref^a 610036) em quadrículas, devidamente identificadas, para cada um dos microrganismos em estudo. De cada poço da microplaca, com o auxílio de uma ansa, foi retirado 1 μL do seu conteúdo e colocado na quadrícula correspondente.

A leitura das placas foi feita 24h após incubação a 30°C, registando-se posteriormente a presença ou ausência de crescimento bacteriano na superfície do meio de cultura sólido.

6. Revestimentos edíveis para controlo de microrganismos na casca do queijo

6.1. Materiais utilizados na preparação dos revestimentos

Para a preparação dos revestimentos utilizou-se como matriz filmogénica o isolado de soro de leite e o quitosano. A amostra de isolado de soro de leite foi gentilmente fornecida pela empresa Carbery Food Ingredients, Ballineen, Co. Cork, Ireland. A amostra de quitosano

(de massa molecular média com um grau de desacetilação mínimo de 85%) foi proveniente da Sigma-Aldrich (ref^a 448877). O glicerol (Honeywell Riedel-de-Haën™ ref^a cat.49770), utilizado como agente plastificante, foi obtido da GPR Rectapur, o tween 20 da Sigma-Aldrich e o tween 80 da Technical. O ácido acético (pureza mínima: 99,8%) foi proveniente da Chem-LAB (ref^aCL00.0116), o carboximetilcelulose (CMC) foi da Fluka (ref^a 21902) e, por fim, o metilcelulose (MC) foi proveniente da Sigma-Aldrich (M0512).

6.2. Desenvolvimento das formulações

Dada a suscetibilidade do queijo ao escurecimento de origem microbiana, este estudo teve como um dos objetivos contribuir para o desenvolvimento de formulações à base de isolado proteico de soro de leite (WPI), quitosano (Ch), carboximetilcelulose (CMC) e metilcelulose (MC), com atividade antimicrobiana contra bactérias associadas a alteração da cor em queijos.

O quitosano é insolúvel em água sendo necessária a sua dissolução numa solução de ácido acético. Nas formulações inicialmente testadas, usou-se ácido acético a 3% e a 1% (v/v). As soluções filmogénicas de quitosano foram preparadas a 1% (m/m), tendo sido agitadas durante 24h num banho termostaticado a uma temperatura de 30°C e a uma velocidade de 60 *shaking*/min para promover a total solubilização. A solução obtida foi depois filtrada com aplicação de vácuo e com um filtro de vidro de granulidade G2 para remover impurezas.

Para a preparação da solução filmogénica de isolado proteico de soro de leite usou-se uma solução de ácido acético diluído a 3%, previamente preparada. As soluções de WPI foram preparadas a 1% (m/m) e submetidas a uma temperatura de 90°C durante 30 minutos num banho termostaticado com agitação (110 *shaking*/min), de modo a promover a desnaturação das proteínas (Pintado, 2009).

Para a preparação dos revestimentos simples verteu-se 33g de solução filmogénica do polímero (ou mistura de polímeros) para as placas de Petri de poliestireno (Glosselin), niveladas com 8,7 mm de diâmetro. Os revestimentos da mistura 50% m/m dos dois polímeros (Ch/WPI) foram preparados de acordo com a Tabela 4, pesando para um tubo de Falcon 16,5g de solução filmogénica do polímero de Ch e 16,5g de solução filmogénica do polímero de WPI. Posteriormente foram adicionados os restantes ingredientes necessários, de acordo com a Tabela 4, os tubos foram agitados fortemente com a mão e, finalmente, verteu-se a mistura filmogénica para as placas de Petri. Todas as placas foram deixadas um dia no frigorífico (4-10°C) para assim facilitar a remoção das bolhas do ar. Por fim, as placas foram colocadas abertas numa câmara fechada com ventilação forçada a 25-30°C para a obtenção de filmes.

Tabela 4 - Diferentes formulações testadas para a obtenção de revestimentos / filmes edíveis à base de isolado proteico de soro de leite (WPI), quitosano (Ch), carboximetilcelulose (CMC) e metilcelulose (MC).

Tipo de Revestimento	Soluções de Ch/WPI	Óleo	Glicerol	Tween 20%	CMC/MC	pH
WPI (1%) com solução de ácido acético a 3%	33g	-	-	-	-	Solução de ácido acético = 3
	33g	-	0,66g	-	-	
	33g	-	1,32g	-	-	
	33g	250µL	-	-	-	
	33g	250 µL	0,66g	-	-	
	33g	250 µL	1,32g	-	-	
	Solução filmogénica = 2,2	33g	250 µL	-	0,17g	-
		33g	250 µL	0,66g	0,17g	-
		33g	250 µL	1,32g	0,17g	-
		16,5g	-	0,66g	-	16,5g
		16,5g	-	1,32g	-	16,5g
		16,5g	-	0,66g	-	16,5g
Ch (1%) com solução de ácido acético a 3%	33g	-	-	-	-	Solução de ácido acético = 3
	33g	250 µL	0,66g	-	-	
	33g	250 µL	1,32g	-	-	
	Solução filmogénica = 2,5	33g	250 µL	-	-	-
		33g	250 µL	-	0,17g	-
		33g	250 µL	0,66g	0,17g	-
Ch (1%) com solução de ácido acético a 1%	33g	250 µL	0,132g	0,17g	-	Solução de ácido acético = 2,71
	33g	-	-	-	-	
	33g	250 µL	-	-	-	
	Solução filmogénica = 3,76	33g	250 µL	-	0,17g	-
		33g	250 µL	0,66g	-	-
		33g	250 µL	0,66g	0,17g	-
WPI (1%) / Ch (1%) com solução de ácido acético a 3%	33g	250 µL	1,32g	0,17g	-	Solução de ácido acético = 3
	33g	250 µL	1,32g	-	-	
	16,5g + 16,5g	-	-	-	-	Solução filmogénica WPI= 2,2
	16,5g + 16,5g	-	0,66g	-	-	
	16,5g + 16,5g	250 µL	-	-	-	
	16,5g + 16,5g	250 µL	0,66g	-	-	
	16,5g + 16,5g	250 µL	1,32g	-	-	
	16,5g + 16,5g	250 µL	-	0,17g	-	
Solução filmogénica Ch= 2,5	16,5g + 16,5g	250 µL	0,66g	0,17g	-	
	16,5g + 16,5g	250 µL	1,32g	0,17g	-	

6.3. Medição da espessura dos filmes

A espessura dos filmes (em mm) foi determinada com um micrómetro digital, em três zonas do filme (ponta direita, meio e ponta esquerda).

6.4. Avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes

Com a finalidade de testar *in vitro* a atividade antimicrobiana dos filmes realizaram-se ensaios em duplicado através do método de difusão em placa. Foi utilizado o meio *Mueller Hinton Agar* (OXOID ref^a CM0337) com 0,8% (v/v) de tween 80. O meio de cultura foi preparado de acordo com as indicações do fabricante.

Para a realização destes ensaios escolheram-se as formulações de quitosano uma vez que foram estes os filmes que obtiveram melhores resultados.

Os filmes foram retirados cuidadosamente das placas de Petri e cortados 12 círculos (de aproximadamente 6 mm de diâmetro) de cada formulação. Após o corte, todos os círculos

foram numerados e identificados com a formulação respetiva (Figura 13). Os discos foram colocados asseticamente nas placas de Petri previamente inoculadas com os microrganismos referidos na Tabela 3. As placas foram depois incubadas a 30°C durante 24 horas. Após incubação, foram medidos e registados os diâmetros das zonas de inibição em redor dos discos de cada filme.

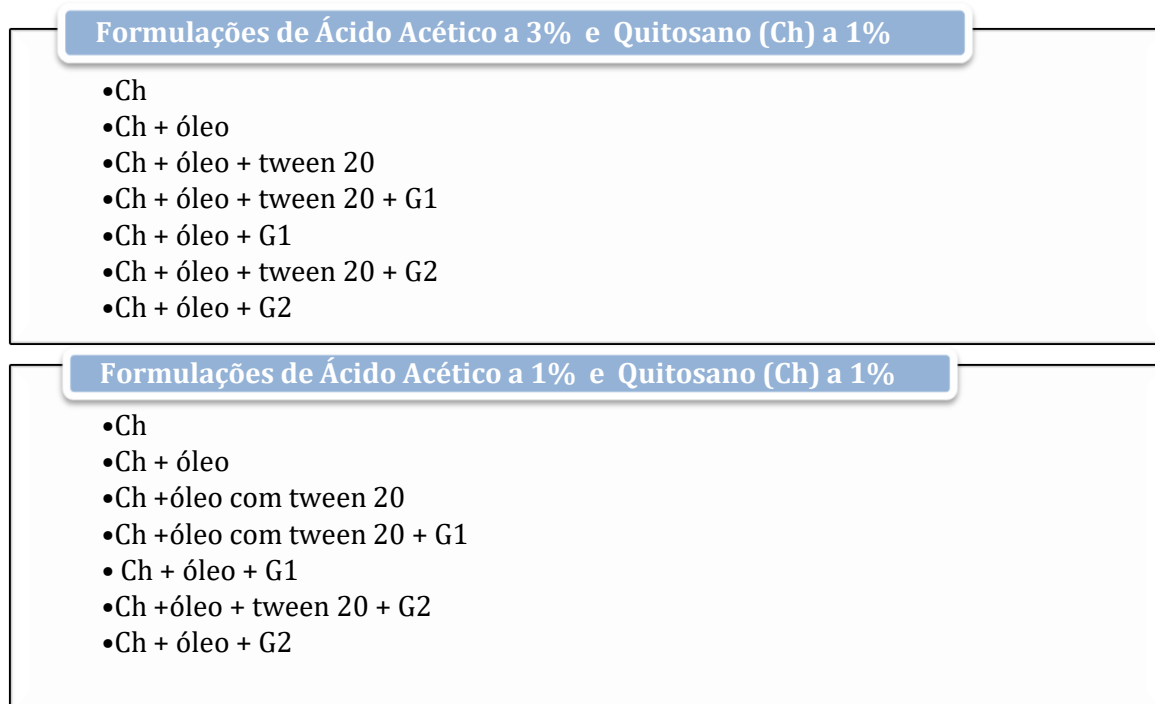


Figura 13 - Diferentes siglas atribuídas às formulações que foram selecionadas para testar a atividade antimicrobiana.

Nota: Ch- Quitosano 1%; G1- Glicerol 2%; G2- Glicerol 4%; Tween 20- (0,5%).

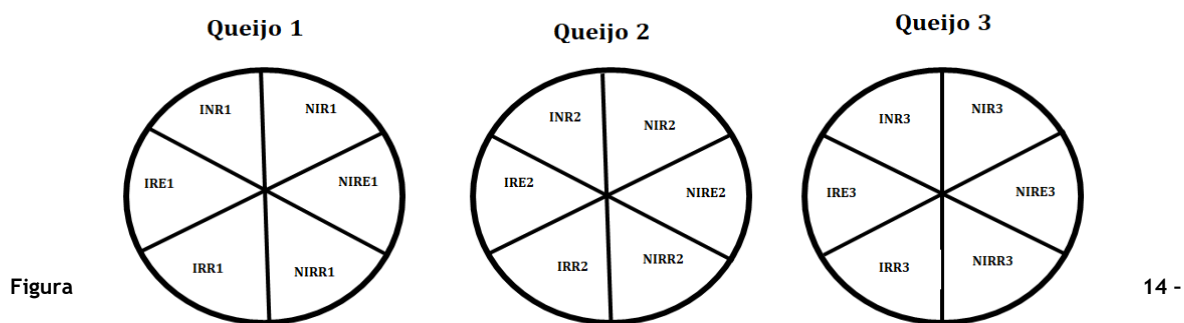
6.5. Ensaio em queijo para avaliar a atividade antimicrobiana da formulação selecionada

Os queijos de ovelha usados neste ensaio eram queijos fabricados no próprio dia, com aproximadamente 900g, e que foram gentilmente fornecidos pela empresa Queijaria da Soalheira de João Duarte Alves & Filhos, Lda.. Utilizou-se a solução filmogénica designada neste trabalho por RR, à base de quitosano (Ch), Tween 20, Glicerol 2% e óleo essencial de *O. vulgare* e, paralelamente, utilizou-se uma solução antifúngica, Enzilab, designada neste trabalho por RE, à base de natamicina, e gentilmente fornecida pela queijaria referida acima.

Foram usados três queijos de ovelha (Queijo 1 – Q1, Queijo 2 – Q2, Queijo 3 – Q3) que foram devidamente cortados em seis fatias como se pode observar na Figura 14. Após o corte dos queijos e etiquetagem das diferentes fatias, seguiu-se a separação das fatias em dois grupos (queijos não inoculados, designados NI, e queijos a inocular, designados I), colocando-os em suportes separados para não ocorrer contaminação cruzada durante e após a inoculação. Um dos grupos foi depois inoculado com uma cultura mista de uma levedura (*Candida zeylanoides*) e de uma bactéria (*Pseudomonas putida* ref^a 27), ambas previamente selecionadas por serem produtoras de pigmentos na casca de queijo. A cultura mista foi

preparada a partir das culturas puras que foram repicadas com 24 a 48 horas de antecedência para a obtenção de cultura jovem. Após o período de incubação, foi preparada uma suspensão de cada inóculo em soro fisiológico a 0,85% (v/v), de acordo com o padrão 0,5 da escala de McFarland (que corresponde a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL para a cultura bacteriana e $1,5 \times 10^7$ UFC/mL para a cultura de levedura). Foi depois efetuada uma diluição decimal de cada um dos inóculos e preparada uma suspensão mista com 5mL de cada um destes inóculos. Finalmente, a inoculação de cada fatia de queijo foi feita à superfície pipetando 100 μ L da cultura mista preparada como descrito anteriormente.

Quer o grupo de queijos inoculados (I) quer o dos não inoculados (NI) foram divididos em três grupos: queijos não revestidos (NR), queijos revestidos com a solução filmogénica designada por RR (à base de quitosano (Ch), Tween 20, Glicerol 2% e óleo essencial de *O. Vulgare*) e queijos revestidos com uma solução antifúngica, Enzilab, designada por RE (à base de natamicina). Os revestimentos RR e RE foram aplicados pincelando a superfície de cada fatia com o respetivo preparado. No final, todas as fatias de queijo foram colocadas numa câmara com condições de temperatura e humidade relativa similares às encontradas na queijaria, onde permaneceram 40 dias. Ao longo do ensaio foi feita uma observação regular da cor dos diferentes grupos de queijo e foi monitorizada a temperatura e a humidade relativa da câmara.



Esquema do corte das amostras de queijo de ovelha usadas no ensaio com os revestimentos.

Como já referido anteriormente, cada uma das fatias de cada queijo foi identificada com uma etiqueta presa a um suporte esterilizado com as diferentes designações que se discriminam a seguir. A utilização dos suportes foi essencial para que toda a manipulação fosse realizada sem que houvesse necessidade de contacto com os queijos, o que poderia ser uma fonte de contaminação externa.

- **I-NR** - Fatia inoculada e não revestida;
- **I-RE** - Fatia inoculada e revestida com o preparado da empresa;
- **I-RR** - Fatia inoculada e revestida com o revestimento RR;
- **NI-NR** - Fatia não inoculada e não revestida;
- **NI-RE** - Fatia não inoculada e revestida com o preparado da empresa, RE;
- **NI-RR** - Fatia não inoculada e revestida com o revestimento RR.

7. Identificação dos componentes químicos do óleo essencial de *Origanum vulgare*

Tendo sido o óleo de orégão o que registou maior efeito antibacteriano, este foi analisado quanto ao seu perfil cromatográfico em cromatógrafo gasoso, tendo sido identificados os compostos por espectrometria de massa.

O perfil volátil do óleo essencial de orégão foi obtido por GC-MS/FID (modelo GC 7890 A, acoplado a MS Triple-Axis Detetor, 5975C e detetor FID, Agilent, EUA). As condições foram as seguintes: temperatura do injetor a 250°C; o volume da injeção a 0,1µL; modo de injeção, sem divisão; coluna capilar, coluna capilar DB-5, 30 m x 0,25 mm d.i x 0,25 µm de espessura de filme; temperatura do forno 70 °C mantida durante 2 min., em seguida, aumentada para 230 °C durante 5 min. O hélio foi o gás de arraste, com um caudal de 1 mL/min; temperatura do detetor a 280°C. A amostra foi diluída em acetato de etilo a uma concentração de 1 mg/mL.

A identificação dos compostos foi realizada com base nas análises comparativas entre os espectros de massa das substâncias com as presentes nas bases de dados GC – MS: Nist. 62 lib. e FFNSC 2 (Flavors and Fragrances of Natural and Synthetic Compounds 2, Willey). A quantidade relativa de cada composto individual foi expressa como a percentagem da área do pico correspondente relativamente à área de todos os picos.

IV. Resultados e Discussão

1. Rendimento de extração dos óleos essenciais e dos extratos aquosos

Do material vegetal seco previamente colhido na Escola Superior Agrária de Castelo Branco e fornecido pela ERVITAL e pelo CBPBI, foi realizada a extração dos óleos essenciais e dos extratos aquosos, em triplicado. Os resultados quanto ao rendimento das extrações apresentam-se nas Figuras 15 e 16.

Relativamente ao rendimento dos óleos essenciais podemos observar que a espécie que obteve maior rendimento foi o *Thymus vulgaris* com 2,5% de rendimento. No que diz respeito à menor percentagem, o que alcançou menor rendimento foi o óleo de *Cymbopogon citratus* e o óleo de *Origanum virens* da ESACB, ambos com uma percentagem de 0,3%. Em relação aos extratos podemos observar que o extrato da espécie *Origanum vulgare* comercial foi o que obteve maior rendimento com uma percentagem de 44,66%. A espécie *Melaleuca armillaris* foi a espécie que obteve menor rendimento com uma percentagem de 18.

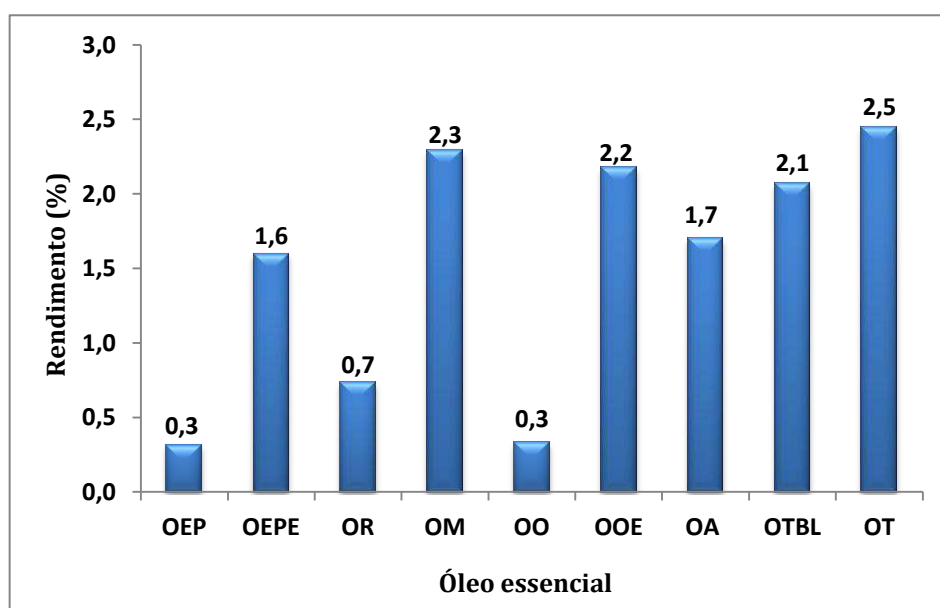


Figura15 - Rendimento médio dos óleos essenciais.

Legenda: OEP- óleo essencial de *Cymbopogon citratus*; OEPE - óleo essencial de *Cymbopogon citratus* da ERVITAL; OR - óleo essencial de *Lavandula luisieri*; OM - óleo essencial de *Melaleuca armillaris*; OO - óleo essencial de *Origanum vulgare*; OOE - óleo essencial de *Origanum vulgare* da ERVITAL; OA- óleo essencial de *Rosmarinus officinalis*; OTBL - óleo essencial de *Thymus mastichina*; OT- óleo essencial de *Thymus vulgaris*.

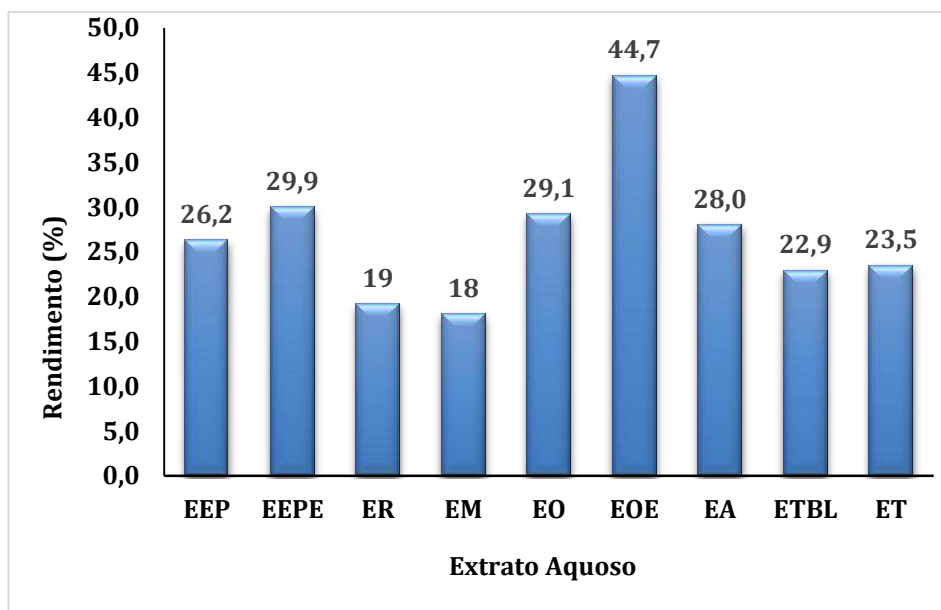


Figura 16 - Rendimento médio dos extratos aquosos.

Legenda: EEP - extrato aquoso de *Cymbopogon citratus*; EEPE - extrato aquoso de *Cymbopogon citratus* da ERVITAL; ER - extrato aquoso de *Lavandula luisieri*; EM - extrato aquoso de *Melaleuca armilaris*; EO - extrato aquoso de *Origanum vulgare*; EOE - extrato aquoso de *Origanum vulgare* da ERVITAL; EA - extrato aquoso de *Rosmarinus officinalis*; ETBL - extrato aquoso de *Thymus mastichina*; ET - extrato aquoso de *Thymus vulgaris*.

2. Identificação dos componentes químicos do óleo essencial de *Origanum vulgare*

Foram identificados 21 compostos químicos no óleo essencial extraído de *Origanum vulgare*. O composto maioritário do óleo essencial desta espécie é o carvacrol (55,34%), sucedendo o timol (33,46), o cariofileno (2,04%) e o γ -terpineno (1,69%). Na figura 17 está representado o cromatograma do óleo essencial.

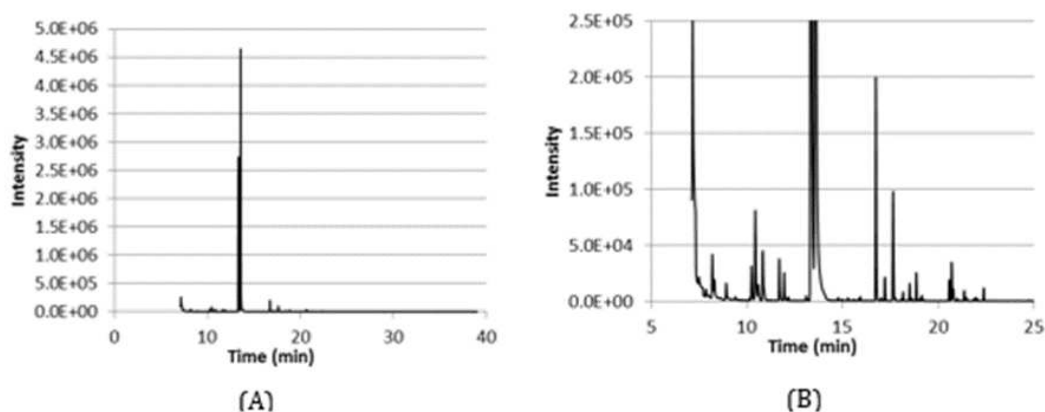


Figura 17 - Cromatograma obtido em cromatografia gasosa do óleo essencial de *Origanum vulgare* - cromatograma (A), e detalhes do cromatograma GC (B).

Todos os compostos químicos do óleo essencial de *Origanum vulgare*, analisados por GC-MS e identificados são revelados na tabela 5.

A maioria dos compostos são monoterpênicos e hidrocarbonetos monoterpênicos oxigenados.

Tabela 5 - Composição química (%) do óleo essencial de *Origanum vulgare*.

Pico	TR (min)	Área %	Composto químico
1	7,17	1,69	γ -terpineno
3	7,88	0,12	α -terpinoleno
4	8,21	0,45	Linalol
5	10,26	0,40	Borneol
6	10,46	1,04	Terpineno-4-ol
7	10,60	0,19	<i>p</i> -cimeno-8-ol
8	10,83	0,68	α -terpineol
9	11,71	0,42	Éter metílico de timol
10	11,96	0,29	Éter metílico de carvacrol
11	13,36	33,46	Timol
12	13,59	55,34	Carvacrol
13	16,76	2,04	Cariofileno
14	17,22	0,23	Aromadendreno
15	17,65	1,08	α -humuleno
16	18,51	0,15	Viridifloreno
17	18,87	0,23	β -bisaboleno
18	20,59	0,18	Spathulenol
19	20,72	0,36	Óxido de cariofileno
20	20,81	0,11	γ -Gurjunene
21	22,39	0,11	9-epi-Caryophyllene
		98,57 %	

Sivropoulou *et al.* (1996) estudou a composição química de *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* e obteve um perfil de componentes maioritários semelhante ao óleo utilizado neste trabalho, carvacrol (80%), *p*-cimeno (9%), timol (3%), γ -terpineno (2%) e o β -cariofileno (2%).

Num estudo realizado por Teixeira *et al.* (2013) foram identificados no óleo essencial de *Origanum vulgare* sessenta e quatro componentes, representando 92,3% de toda a composição. O óleo essencial foi composto principalmente por monoterpênicos oxigenados (53,8%) e hidrocarbonetos monoterpênicos (26,4%). Nos monoterpênicos oxigenados, o carvacrol (14,5%), o timol (12,6%), o álcool β -fentílico (12,8%) e o α -terpineol (7,5%) foram os principais componentes detetados, enquanto o β -terpineno (11,6%) e o α -terpineno (3,7%) foram os hidrocarbonetos monoterpênicos mais abundantes. Adicionalmente, o 1-metil-3-(1-metiletil)-benzeno (6,8%) também representou uma fracção substancial do óleo essencial de *Origanum vulgare*. Carvacrol, timol, γ -terpineno e linalol são conhecidos por possuírem fortes propriedades antioxidantes e o carvacrol e o timol também exibem atividade antibacteriana contra várias bactérias. Outros quimiotipos também foram relatados como importantes componentes do óleo essencial, tais como *p*-cimeno, γ -terpineno, cariofileno, espatulenol e germacreno-D (Sivropoulou *et al.*, 1996).

A composição do óleo essencial de *Origanum vulgare* de diferentes origens geográficas, tem sido caracterizada por vários autores, sendo o carvacrol e o timol os principais componentes, embora as proporções variem amplamente. Estas variações no teor dos componentes maioritários podem dever-se a fatores bióticos e abióticos, tais como a época de colheita, a temperatura, a humidade relativa do ar e até mesmo a parte escolhida da planta (Calo *et al.*, 2015).

3. Ensaio prévios da atividade antimicrobiana

Todos os óleos essenciais e extratos aquosos testados manifestaram alguma inibição no método da gota (G) e/ou do disco (D), sendo que esta varia consoante a cultura bacteriana testada.

Observando a Tabela 6, podemos verificar que apenas o óleo de *Origanum vulgare* apresentou inibição total para todas as culturas bacterianas, quer no teste utilizando uma gota de 5 µL quer utilizando 10 µL em disco, sendo desta forma considerado o melhor óleo estudado. Nos outros óleos verificou-se alguma inibição face às culturas estudadas, mas nem sempre os resultados obtidos pelos dois métodos foram coincidentes.

Tabela 6 - Registo da atividade antimicrobiana de diferentes óleos essenciais sobre a multiplicação de diferentes culturas bacterianas do género *Pseudomonas* e géneros afins.

Ref ^o dos microrganismos	Óleos essenciais																	
	OEP		OEP (E)		OR		OM		OO		OO (E)		OA		OTBL		OT	
	G	D	G	D	G	D	G	D	G	G	G	D	G	D	G	D	G	D
2	T	T	P	P	P	P	T	T	-	-	T	T	P	S	P	P	T	S
7	T	T	S	S	S	S	P	T	-	-	T	T	T	T	T	T	T	T
9	P	P	S	S	S	S	T	T	T	T	T	T	T	T	S	S	T	T
27	P	P	S	S	S	S	P	S	P	T	T	T	P	S	P	S	P	T
29	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-	T	T	S	S	P	P	S	S
67	T	T	S	S	T	T	P	T	-	-	T	T	P	S	P	P	T	P
132	-	-	S	S	S	S	S	S	-	S	T	T	S	S	P	P	S	S
137	T	T	S	S	T	T	P	P	T	T	T	T	P	P	P	P	T	T
153	T	T	S	S	P	P	P	S	T	T	T	T	T	S	P	P	T	T
184	P	P	S	S	S	S	S	P	T	T	T	T	P	P	P	P	P	T
191	S	S	S	S	S	S	T	T	T	T	T	T	T	T	P	P	T	T

Legenda: T - Inibição total; P- Inibição parcial; S - Sem inibição. G- Método da gota; D- Método do disco. 2 - *Pseudomonas fluorescens*; 7 - *Alcaligenes faecalis*; 9 - *Achromobacter xylosoxidans*; 27 - *Pseudomonas putida*; 29 - *Pseudomonas putida*; 67 - *Pseudomonas fluorescens*; 132 - *Achromobacter xylosoxidans*; 137 - *Pseudomonas fluorescens*; 153 - *Pseudomonas fluorescens*; 184 - *Pseudomonas putida*; 191 - *Pseudomonas putida*; OEP - óleo essencial de *Cymbopogon citratus*; OEP (E) - óleo essencial de *Cymbopogon citratus* da ERVITAL; OR - óleo essencial de *Lavandula luisieri*; OM - óleo essencial de *Melaleuca armillaris*; OO - óleo essencial de *Origanum vulgare*; OO (E) - óleo essencial de *Origanum vulgare* da ERVITAL; OA - óleo essencial de *Rosmarinus officinalis*; OTBL - óleo essencial de *Thymus mastichina*; OT - óleo essencial de *Thymus vulgaris*.

Na Tabela 7 podemos observar todos os resultados obtidos nos ensaios prévios dos extratos aquosos. O extrato da espécie da *Melaleuca armillaris* foi o que apresentou melhores resultados, coincidente nos dois métodos. A maioria dos extratos aquosos não exerce inibição sobre as culturas dos microrganismos estudados.

Tabela 7 - Registo da atividade antimicrobiana de diferentes extratos aquosos sobre a multiplicação de diferentes culturas bacterianas do género *Pseudomonas* e géneros afins.

Ref ^a dos microrganismos	Extratos aquosos																	
	EEP		EEP (E)		ER		EM		EO		EO (E)		EA		ETBL		ET	
	G	D	G	D	G	D	G	D	G	G	G	D	G	D	G	D	G	D
2	S	S	S	S	P	P	T	T	S	S	S	S	S	S	P	P	S	S
7	S	S	S	S	P	P	P	T	S	S	T	T	T	S	T	T	S	S
9	P	P	S	S	P	P	T	T	P	P	S	S	P	T	P	P	P	P
27	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
29	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
67	S	S	S	S	S	S	P	T	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
132	P	S	S	S	S	S	S	S	T	T	S	S	T	T	S	S	P	T
137	S	S	S	S	S	S	P	P	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
153	S	S	S	S	S	S	P	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
184	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	T	T	S	S	S	S	S	S
191	P	T	T	T	S	S	T	T	P	P	P	P	S	S	S	S	P	S

Legenda: T - Inibição total; P- Inibição parcial; S - Sem inibição. G- Método da gota; D- Método do disco. 2 - *Pseudomonas fluorescens*; 7 - *Alcaligenes faecalis*; 9 - *Achromobacter xylosoxidans*; 27 - *Pseudomonas putida*; 29 - *Pseudomonas putida*; 67 - *Pseudomonas fluorescens*; 132 - *Achromobacter xylosoxidans*; 137 - *Pseudomonas fluorescens*; 153 - *Pseudomonas fluorescens*; 184 - *Pseudomonas putida*; 191 - *Pseudomonas putida*. EEP - extrato aquoso de *Cymbopogon citratus*; EEP (E) - extrato aquoso de *Cymbopogon citratus* da ERVITAL; ER - extrato aquoso de *Lavandula luisieri*; EM - extrato aquoso de *Melaleuca armilaris*; EO - extrato aquoso de *Origanum vulgare*; EO (E) - extrato aquoso de *Origanum vulgare* da ERVITAL; EA - extrato aquoso de *Rosmarinus officinalis*; ETBL - extrato aquoso de *Thymus mastichina*; ET - extrato aquoso de *Thymus vulgaris*.

4. Concentração mínima inibitória (MIC)

Após a incubação das microplacas e a adição da solução de resazurina, foi efetuado o registo da alteração de cor nos diferentes poços e, posteriormente, definidas as concentrações mínimas inibitórias.

Os óleos de orégão (OO) e de erva-príncipe (OEP) obtidos de plantas que se encontravam na Escola Superior Agrária, óleo de *Thymus mastichina* (OTBL) cedido pelo Instituto Politécnico de Coimbra e o óleo de *Lavandula luisieri* (OR) cedido pelo Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior, foram inicialmente pensados para testar as culturas selecionadas para o nosso estudo. No entanto verificámos que o volume de óleo essencial obtido da hidrodestilação não eram suficientes para realizar todo o trabalho. Por outro lado, em algumas plantas não houve material suficiente para realizar novas hidrodestilações. No entanto, inicialmente foram realizados ensaios de determinação da concentração mínima inibitória e bactericida destes óleos essenciais para a maioria das culturas de microrganismos. Estes resultados apresentam-se nas Tabelas 1 e 2 do Anexo 1 e Tabelas 2 e 3 do Anexo 2.

Posteriormente, optámos por adquirir novas plantas comerciais fornecidas pela empresa ERVITAL, nomeadamente a espécie de *Origanum vulgare* e *Cymbopogon citratus*. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 8, podemos verificar que em concordância com os resultados obtidos nos ensaios prévios (Tabela 6), o óleo de *Origanum vulgare* foi o que apresentou uma concentração mínima inibitória (MIC) mais baixa, de 0,05%, para as culturas 7, 132, 137, 153, 184 e 191, considerando-o, portanto, o óleo com maior potencial antimicrobiano do nosso estudo.

Para todos os outros óleos testados foi possível determinar os valores de MIC para quase todas as culturas onde inicialmente observámos inibição nos ensaios prévios (conforme Tabela 6).

Como podemos verificar observando a Tabela 8, a determinação dos MIC's nem sempre foi coincidente nas repetições realizadas.

Diversos estudos confirmaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de orégão contra uma vasta gama de microrganismos, entre eles bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (Özkalp *et al.*, 2010). Segundo Özkalp *et al.* (2010) obtiveram um valor de concentração mínima inibitória (MIC) de 64 µg/mL contra *Pseudomonas aeruginosa*. A forte atividade antimicrobiana do óleo essencial de orégão foi também confirmada em diversos estudos, nomeadamente contra as bactérias *Listeria monocytogenes* e *E.coli* O157:H7 (Zivanovic *et al.*, 2005).

Tabela 8 - Concentração mínima microbicida (MIC; %, v/v) de diferentes óleos essenciais sobre a multiplicação de diferentes culturas bacterianas do género *Pseudomonas* e géneros afins.

Ref ^a Microrganismos	Óleos essenciais				
	OEP	OM	OO	OA	OT
2	4,49	1,204	1,204	(-)	0,33
7	4,49	0,33	0,05	0,63	0,124
9	(-)	2,324	0,63	1,204	0,33
27	8,69	(-)	4,49	(-)	2,324
			8,69	(-)	
29	8,69	(-)	1,204	(-)	(-)
			0,33		
	8,69	1,204	8,69	(-)	0,63
67					0,33
132	0,05	(-)	0,05	(-)	-
137	8,69		0,05	(-)	1,204
153	4,49	(-)	0,05	8,69	1,204
				4,49	
184	4,49	(-)	0,05	(-)	0,63
191	(-)	2,324	0,05	4,49	0,63
				2,324	

Legenda: (-) Cor não conclusiva; (--) Sem inibição; 2 - *Pseudomonas fluorescens*; 7 - *Alcaligenes faecalis*; 9 - *Achromobacter xylosoxidans*; 27 - *Pseudomonas putida*; 29 - *Pseudomonas putida*; 67 - *Pseudomonas fluorescens*; 132 - *Achromobacter xylosoxidans*; 137 - *Pseudomonas fluorescens*; 153 - *Pseudomonas fluorescens*; 184 - *Pseudomonas putida*; 191 - *Pseudomonas putida*; OEP - óleo essencial de *Cymbopogon citratus*; OM - óleo essencial de *Melaleuca armillaris*; OO- óleo essencial de *Origanum vulgare*; OA - óleo essencial de *Rosmarinus officinalis*; OT - óleo essencial de *Thymus vulgaris*.

Relativamente aos extratos testados podemos observar na Tabela 9 que poucos foram os resultados que apresentaram uma inibição total nos ensaios prévios. Ainda assim, seleccionámos alguns para a determinação dos MIC's onde, apesar de fraca, se verificava alguma inibição. O extrato aquoso de *Melaleuca armillaris* foi o que exerceu maior inibição para as culturas 2, 7, 9, 27, 132, 137 e 191.

Tabela 9 - Concentração mínima inibitória (MIC; %, v/v) de diferentes extratos aquosos de plantas sobre a multiplicação de diferentes culturas bacterianas do género *Pseudomonas* e géneros afins.

Extratos aquosos					
Ref ^a	EEP	EM	EO	EA	ET
Microrganismos					
2	(--)	2,324	(--)	(--)	(--)
		0,05			
7	(--)	4,49	>8,69	>8,69	(--)
9	(--)	2,324	(--)	1,204	(--)
27	(--)	>8,69	(--)	(--)	(--)
29	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)
67	(--)	(--)	(--)	(--)	-
132	(--)	0,63	(--)	0,63	4,49
137	(--)	8,69	(--)	(--)	(--)
153	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)
184	(--)	(--)	8,69	(--)	(--)
191	8,69	>8,69	(--)	(--)	(--)

Legenda: (--) Sem inibição; 2 - *Pseudomonas fluorescens*; 7 - *Alcaligenes faecalis*; 9 - *Achromobacter xylosoxidans*; 27 - *Pseudomonas putida*; 29 - *Pseudomonas putida*; 67 - *Pseudomonas fluorescens*; 132 - *Achromobacter xylosoxidans*; 137 - *Pseudomonas fluorescens*; 153 - *Pseudomonas fluorescens*; 184 - *Pseudomonas putida*; 191 - *Pseudomonas putida*; EEP - extrato aquoso de *Cymbopogon citratus*; EM - extrato aquoso de *Melaleuca armilarris*; EO - extrato aquoso de *Origanum vulgare*; EA - extrato aquoso de *Rosmarinus officinalis*; ET - extrato aquoso de *Thymus vulgaris*.

Nas Figuras 18 e 19 podemos observar exemplos de microplacas após a leitura dos valores de MIC.

No decorrer das leituras das microplacas usadas nos ensaios com os extratos aquosos surgiram dúvidas na interpretação dos resultados devido à cor escura apresentada pelo próprio extrato (Figura 18).

Podemos ainda observar na Tabela 9 que as concentrações mínimas inibitórias foram de um modo geral altas e por vezes superiores à concentração mais alta testada, o que nos leva a concluir que os extratos são bastante menos eficazes do que os óleos, face aos microrganismos usados e nas concentrações por nós estudadas.

Segundo Oussalah *et al.* (2005), normalmente as bactérias Gram-negativas são mais resistentes do que as Gram-positivas devido à sua maior complexidade da parede celular. Estas possuem uma membrana externa na parede celular a qual limita a difusão dos compostos hidrofóbicos através da camada de lipopolissacáridos (Burt, 2004).

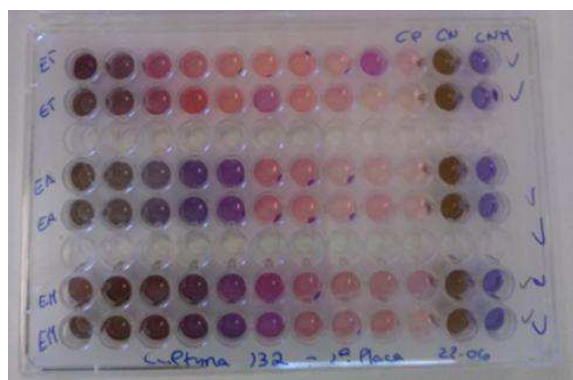


Figura 18 - Exemplo de uma microplaca com extrato aquoso de *Thymus vulgaris* (ET), *Rosmarinus officinalis* (EA) e *Melaleuca armillaris* (EM).

Legenda: Cultura132 *Achromobacter xylosoxidans*.

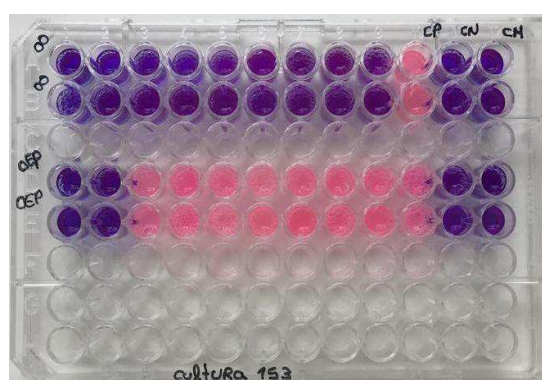


Figura 19 - Exemplo de uma microplaca com óleo essencial de *Origanum vulgare* (OO) e *Cymbopogon citratus* (OEP).

Legenda: Cultura 153 - *Pseudomona fluorescens*.

5. Concentração mínima bactericida (MBC)

A concentração mínima bactericida (MBC) é definida como a menor concentração do agente antimicrobiano necessária para matar a célula bacteriana. Quando os valores de MBC são comparados com os de MIC, pode-se avaliar se o composto é bactericida ou bacteriostático.

Na Tabela 10 podemos observar os resultados obtidos para a concentração mínima bactericida dos diferentes óleos estudados. À semelhança do que se observou nos ensaios prévios (Tabela 6) e na determinação da concentração mínima inibitória (Tabela 8), o óleo de *Origanum vulgare* foi o que apresentou maior atividade antimicrobiana, com uma concentração mínima bactericida de 0,05%.

Tendo em conta os resultados obtidos da caracterização química dos componentes do óleo essencial de *Origanum vulgare*, o composto maioritário foi o carvacrol (55,34%). De acordo com Burt (2004), o carvacrol forma canais através da membrana pelo afastamento das cadeias dos ácidos gordos dos fosfolípidos, permitindo que os iões saiam do citoplasma. Ainda segundo o mesmo autor, foi observada a saída dos iões fosfato em cultura de *Staphylococcus aureus* e de *Pseudomonas aeruginosa*.

Tabela 10 - Concentração mínima bactericida (MBC; %, v/v) de diferentes óleos essenciais sobre a multiplicação de diferentes culturas bacterianas do género *Pseudomonas* e géneros e afins.

Ref ^a	Óleos essenciais				
	OEP	OM	OO	OA	OT
2	0,33	1,204	1,204	0,63	0,33
7	0,33	0,63	0,05	-	0,33
9	1,204	8,69	2,324	2,324	1,204
			1,204	4,49	
27	8,69	-	4,49	-	8,69
			8,69	-	
29	(-)	-	8,69	-	-
67	(-)	1,204	>8,69	-	(-)
132	-	-	0,05	-	-
137	-	-	0,63	-	-
153	1,204	-	0,05	8,69	1,204
184	0,63	-	0,05	-	0,63
191	(-)	-	0,05	4,49	(-)
				2,324	

Legenda: (-) Cor não conclusiva; (--) Sem inibição; **2** - *Pseudomonas fluorescens*; **7** - *Alcaligenes faecalis*; **9** - *Achromobacter xylosoxidans*; **27** - *Pseudomonas putida*; **29** - *Pseudomonas putida*; **67** - *Pseudomonas fluorescens*; **132** - *Achromobacter xylosoxidans*; **137** - *Pseudomonas fluorescens*; **153** - *Pseudomonas fluorescens*; **184** - *Pseudomonas putida*; **191** - *Pseudomonas putida*; **OEP** - óleo essencial de *Cymbopogon citratus*; **OM** - óleo essencial de *Melaleuca armillaris*; **OO** - óleo essencial de *Origanum vulgare*; **OA** - óleo essencial de *Rosmarinus officinalis*; **OT** - óleo essencial de *Thymus vulgare*.

Na Tabela 11 podemos observar os resultados obtidos para a concentração mínima bactericida para os extratos aquosos. À semelhança do que se observou nos ensaios prévios (Tabela 7) e na determinação da concentração mínima inibitória (Tabela 9) foi o extrato de *Melaleuca armillaris* que apresentou maior atividade antimicrobiana, com os valores mais baixos de MBC.

Tabela 11 - Concentração mínima bactericida (MBC; %, v/v) de diferentes extratos essenciais sobre a multiplicação de diferentes culturas bacterianas do género *Pseudomonas* e géneros afins.

Ref ^a Microrganismos	Extratos aquosos					
	EEP	EM	EO	ER	ET	
2	(--)	2,324	(--)	(--)	(--)	
		0,05		>8,69	(--)	
7	(--)	2,324	>8,69	2,324	(--)	
9	(--)	8,69	(--)	(--)	(--)	
27	(--)	>8,69	(--)	(--)	(--)	
29	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	
67	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	
132	(--)	0,63	(--)	(--)	>8,69	
137	(--)	(--)	(--)	0,63	(--)	
153	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	
184	(--)	(--)	>8,69	(--)	(--)	
191	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	

Legenda: (--) Sem inibição; 2 - *Pseudomonas fluorescens*; 7 - *Alcaligenes faecalis*; 9 - *Achromobacter xylosoxidans*; 27 - *Pseudomonas putida*; 29 - *Pseudomonas putida*; 67 - *Pseudomonas fluorescens*; 132 - *Achromobacter xylosoxidans*; 137 - *Pseudomonas fluorescens*; 153 - *Pseudomonas fluorescens*; 184 - *Pseudomonas putida*; 191 - *Pseudomonas putida*. EEP - extrato aquoso de *Cymbopogon citratus*; EM- extrato aquoso de *Melaleuca armillaris*; EO - extrato aquoso de *Origanum vulgare*; EA- extrato aquoso de *Rosmarinus officinalis*; ET- extrato aquoso de *Thymus vulgaris*.

6. Revestimentos/filmes com óleos essenciais para inibição de *Pseudomonas* e géneros afins

6.1. Características visuais dos filmes estudados

No Anexo 3 (Tabela 5) encontram-se todos os resultados das formulações testadas neste estudo. Da análise destes resultados, decidimos optar pela utilização das formulações à base de quitosano com uma solução de ácido acético de 3 % e 1%. Na Tabela 12 encontram-se as características visuais dos filmes obtidos à base de quitosano, os quais foram selecionados.

Tabela 12 - Resultados das formulações dos filmes estudados.

Tipo de Formulação	Aspetto visual (após secagem)	Propriedades mecânicas
Ch 1% + Ácido acético 3%		
Ch	Homogéneo	Rígido (difícil de cortar)
Ch + Óleo	Coloração amarelada e heterogéneo	Rígido (difícil de cortar)
Ch + G1 + Óleo	Homogéneo	Rígido (difícil de cortar)
Ch + G2 + Óleo	Transparente e homogéneo	Fácil de cortar
Ch + G1 + Óleo + Tween 20	Opaco e pegajoso	Não quebrou e tem uma boa elasticidade
Ch + G2 + Óleo + Tween 20	Opaco mas homogéneo	Não quebrou
Ch + Óleo + Tween 20	Coloração amarelada e heterogéneo	Rígido, difícil de cortar
Ch 1% + Ácido acético 1 %		
Ch	Transparente e homogéneo	Rígido mas não quebrou
Ch + Óleo	Transparente e homogéneo	Não quebrou e tem elasticidade
Ch + G1 + Óleo	Transparente e homogéneo	Não quebrou e é fácil de cortar (tem pouca elasticidade)
Ch + G2 + Óleo	Transparente e homogéneo	Não quebrou e é fácil de cortar
Ch + G1 + Óleo + Tween 20	Transparente e homogéneo	Fácil de cortar e tem elasticidade
Ch + G2 + Óleo + Tween 20	Transparente e homogéneo mas um pouco pegajoso	Não quebrou e é fácil de cortar
Ch + Óleo + tween 20	Coloração amarelada, opaco e heterogénea	Rígido e sem elasticidade mas fácil de retirar

6.2. Medição da espessura do filme

A primeira característica testada nos filmes após o processo de produção foi a sua espessura. Na Tabela 13 podemos observar o resultado da espessura média dos filmes de quitosano.

Tabela 13 - Espessura média (mm) dos filmes de quitosano (Ch).

Formulações	1	2	3	4	5	6	7
Ch a 1% com ácido acético a 3%							
(Ponta direita)	0,08	0,23	0,16	0,25	0,21	0,05	0,09
	0,08	0,18	0,18	0,11	0,21	0,14	0,07
(Meio)	0,09	0,31	0,18	0,26	0,28	0,08	0,19
	0,08	0,24	0,17	0,12	0,27	0,27	0,05
Ponta esquerda)	0,07	0,24	0,30	0,29	0,27	0,05	0,08
	0,05	0,22	0,10	0,08	0,25	0,14	0,05
Média	0,08	0,26	0,22	0,25	0,26	0,18	0,12
	0,07	0,21	0,15	0,10	0,24	0,18	0,06
Ch a 1% com ácido acético a 1%							
(Ponta direita)	0,15	0,05	0,16	0,12	0,16	0,2	0,26
	0,15	0,05	0,17	0,12	0,12	0,14	0,14
	0,13	0,06	0,25	0,15	0,16	0,33	0,33
(Meio)	0,12	0,06	0,25	0,16	0,17	0,16	0,16
	0,16	0,06	0,15	0,11	0,14	0,20	0,20
(Ponta esquerda)	0,16	0,06	0,15	0,12	0,16	0,13	0,13
	0,15	0,06	0,19	0,13	0,15	0,26	0,26
Média	0,14	0,06	0,19	0,13	0,15	0,14	0,14

Legenda das formulações:

- 1 - Quitosano (Ch);
- 2- Quitosano (Ch) + óleo + Tween 20+G1;
- 3- Quitosano (Ch) + óleo + Tween 20 + G2;
- 4 - Quitosano (Ch) + óleo + G1;
- 5- Quitosano (Ch) + óleo + G2;
- 6 - Quitosano (Ch) + óleo + Tween 20;
- 7- Quitosano (Ch) + óleo.

6.3. Avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes

Nas Tabelas 14 e 15 apresentam-se os resultados da medição dos diâmetros das zonas de inibição em redor dos discos de cada um dos filmes desenvolvidos.

Com base nos resultados obtidos podemos concluir que a formulação 4, à base de quitosano (1%), óleo essencial de *Origanum vulgare*, tween 20 (0,5%) e glicerol (2%), foi a que apresentou melhores resultados, tendo sido esta a selecionada para o ensaio de aplicação em queijo.

Diversos estudos têm vindo a ser desenvolvidos no sentido da aplicação de revestimentos com o uso de quitosano (Ch) e com a adição de óleos essenciais. Zivanovic *et al.* (2005) revelaram a atividade antimicrobiana de revestimentos à base quitosano (Ch) com óleo de *Origanum sp.* contra a bactéria *E.coli* O157:H7 (Gram-negativa). Estes resultados demonstram o potencial do uso dos revestimentos no controlo de microrganismos patogénicos alimentares. Chi *et al.* (2006) também realizaram revestimentos com quitosano (Ch) enriquecido com óleo essencial de orégão onde avaliaram sensorialmente o revestimento, demonstrando a aceitação deste pelo painel de consumidores.

Tabela 14 - Resultados da avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes, através da medição dos diâmetros das zonas de inibição (mm) com quitosano a 1% e ácido acético a 3%.

Formulações							
Ref ^a	1	2	3	4	5	6	7
microrganismos	Quitosano a 1% e Ácido acético a 3%						
2	10,43	IC	IC	8,87	IC	IC	IC
	IC	IC	IC	IC	IC	10,17	IC
7	IC	8,68	IC	IC	IC	IC	13,47
	IC	8,60	9,20	IC	IC	IC	IC
9	IC	11,86	11,54	10,64	9,66	IC	12,14
	11,10	8,20	13,51	IC	IC	18,26	IC
27	IC	8,33	7,966	9,82	9,66	IC	IC
	IC	IC	10,72	9,35	IC	IC	10,62
29	IC	IC	IC	IC	IC	IC	IC
	IC	IC	IC	IC	IC	IC	IC
67	IC	IC	IC	IC	IC	IC	13,07
132	12,34	12,22	11,13	10,40	8,3	13,48	14,1
	12,12	10,04	12,75	8,74	11,69	16,70	10,14
137	IC	IC	IC	IC	IC	IC	IC
	IC	IC	IC	IC	IC	IC	IC
153	11,07	8,68	9,60	13,11	9,01m	IC	IC
	IC	IC	IC	IC	IC	IC	IC
184	SI	7,88	8,66	9,68	8,96	IC	11,10
	SI	IC	8,16	IC	IC	IC	IC
191	SI	8,08	9,85	IC	9,25	9,88	IC
	IC	IC	8,56	IC	IC	9,93	IC

Legenda: 1 - Ch; 2- Ch + óleo essência + Tween 20 + G1; 3-Ch + óleo + Tween 20 + G2; 4 - Ch + óleo + G1; 5- Ch + óleo +G2; 6 - Ch + óleo +Tween 20 ; 7- Ch + óleo essencial; IC - Inibição por contato; SI- Sem inibição. 2 - *Pseudomonas fluorescens*; 7 - *Alcaligenes faecalis*; 9 - *Achromobacter xylosoxidans*; 27 - *Pseudomonas putida*; 29 - *Pseudomonas putida*; 67 - *Pseudomonas fluorescens*; 132 - *Achromobacter xylosoxidans*; 137 - *Pseudomonas fluorescens*; 153 - *Pseudomonas fluorescens*; 184 - *Pseudomonas putida*; 191 - *Pseudomonas putida*.

Tabela 15 - Resultados da avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes, através da medição dos diâmetros das zonas de inibição (mm) quitosano a 1% e ácido acético a 1%.

Formulações							
Ref ^a	1	2	3	4	5	6	7
microrganismos	Quitosano a 1% e ácido acético a 1%						
2	8,89	IC	IC	IC	IC	IC	8,51
	IC	IC	IC	IC	IC	IC	IC
7	IC	IC	IC	IC	9,92	IC	IC
	IC	IC	IC	IC	11,16	12,00	IC
9	9,82	9,83	9,21	10,02	IC	9,37	IC
	10,51	9,71	9,21	10,90	12,22	7,67	9,09
27	IC	IC	IC	6,60	IC	IC	9,83
	IC	IC	IC	6,60	11,02	8,81	IC
29	IC	IC	IC	IC	IC	IC	IC
	IC	IC	IC	IC	IC	IC	IC
67	SI	SI	SI	SI	SI	IC	IC
	SI	SI	SI	SI	12,81	IC	IC
132	11,43	11,70	9,91	10,74	11,85	12,43	10,02
	17,41	13,21	10,27	14,2	12,31	9,72	IC
137	8,13	IC	IC	8,74	IC	IC	IC
	IC	IC	IC	8,74	IC	IC	IC
153	IC	IC	IC	12,16	IC	IC	IC
	IC	IC	IC	12,16	IC	IC	IC
184	IC	SI	9,25	11,86	9,51	IC	IC
	IC	IC	IC	9,38	8,24	IC	IC
191	IC	IC	IC	8,60	8,12	IC	IC
	IC	IC	9,60	8,60	IC	IC	IC

Legenda: 1 - Ch; 2- Ch + óleo essencial; 3- Ch + óleo essencial + Tween 20 + G1; 4 - Ch + óleo essencial + G1; 5- Ch + óleo essencial + tween 20 6 - Ch + óleo essencial + tween 20 + G2; 7- Ch + óleo essencial + G2; IC - Inibição por contato; SI- Sem inibição. 2 - *Pseudomonas fluorescens*; 7 - *Alcaligenes faecalis*; 9 - *Achromobacter xylosoxidans*; 27 - *Pseudomonas putida*; 29 - *Pseudomonas putida*; 67 - *Pseudomonas fluorescens*; 132 - *Achromobacter xylosoxidans*; 137 - *Pseudomonas fluorescens*; 153 - *Pseudomonas fluorescens*; 184 - *Pseudomonas putida*; 191 - *Pseudomonas putida*.

6.4. Ensaio em queijo para avaliar a atividade antimicrobiana da formulação selecionada

O ensaio em queijo para testar a aplicabilidade e a atividade antimicrobiana da formulação selecionada foi inconclusivo na medida em que os queijos inoculados e não revestidos não desenvolveram as alterações de cor à superfície dos queijos, como era esperado. Este facto pode dever-se às condições ambientais a que estiveram sujeitos os queijos neste ensaio. Ao longo do período de maturação, foi efetuado o registo diário da temperatura e da humidade relativa da câmara, tendo-se verificado que, especialmente no que diz respeito o último parâmetro, os valores foram mais baixos do que os encontrados normalmente nas câmaras de maturação das queijarias. Sendo este um ensaio com queijos inoculados com microrganismos indesejáveis, deparámo-nos com uma limitação no que toca ao local onde efetuar a maturação, não sendo indicada a utilização das câmaras das queijarias. Sugere-se, num próximo ensaio desta natureza, a utilização de câmaras de maturação experimentais, com controlo rigoroso das condições ambientais de maturação.

V. Considerações finais

O principal objetivo deste trabalho consistiu no estudo da atividade antimicrobiana de óleos essenciais e extratos aquosos de plantas das espécies *Cymbopogon citratus*, *Lavandula luisieri*, *Melaleuca armillaris*, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus mastichina* e *Thymus vulgaris* no controlo de microrganismos de alteração de superfície de queijos, nomeadamente ao nível da produção de pigmentos. Os microrganismos testados foram onze diferentes culturas bacterianas das espécies *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Alcaligenes faecalis* e *Achromobacter xylosoxidans*.

As hidrodestilações realizadas nas diversas espécies das plantas usadas permitiram obter o óleo essencial e os extratos aquosos. O maior rendimento de óleo essencial obteve-se para *Thymus vulgaris* com 2,5%, seguindo-se o rendimento de *Melaleuca armillaris* com 2,3%. Por outro lado, as espécies *Cymbopogon citratus* e *Origanum vulgare* obtiveram o menor rendimento de extração com 0,3%. Relativamente aos extratos aquosos, o maior rendimento obteve-se para a espécie *Origanum vulgare* comercial (44,7%), sendo o menor rendimento para a espécie *Melaleuca armillaris* (18%).

Relativamente aos ensaios de atividade antimicrobiana, o óleo essencial de *Origanum vulgare* foi o único que exerceu inibição total em todas as culturas testadas, considerando-o, portanto, o melhor óleo estudado. Em relação à concentração mínima inibitória (MIC) e à concentração mínima bactericida (MBC) este óleo essencial foi o que apresentou uma concentração mais baixa, de 0,05%, para a cultura 7 (*Alcaligenes faecalis*), cultura 132 (*Achromobacter xylosoxidans*), culturas 137 e 153 (*Pseudomonas fluorescens*) e culturas 184 e 191 (*Pseudomonas putida*).

A análise química realizada ao óleo essencial de *Origanum vulgare* revelou que o componente maioritário é o carvacrol (55,34%), sucedendo o timol (33,46%), o cariofileno (2,04%) e o γ -terpineno (1,69%).

O óleo essencial de *Origanum vulgare* foi o selecionado para testar nas formulações filmogénicas, tendo-se optado pela matriz filmogénica à base de quitosano (Ch), ácido acético, glicerol, tween 20 e o óleo essencial de oregão. Em relação à aplicação deste revestimento edível e ao preparado pela empresa, durante o período experimental de 40 dias, não se conseguiram obter os resultados expectáveis, pois não ocorreu formação de pigmentos visíveis e por sua vez não houve alteração de cor na superfície da casca do queijo. Sendo este ensaio final determinante no sucesso da aplicação da formulação do revestimento edível, torna-se importante no futuro desenvolver novos ensaios em queijos garantindo condições similares às existentes nas câmaras de maturação utilizadas nas queijarias.

VI. Referências bibliográficas

- Afra, A. B.; Combes, S. Preziosi-Belloy, L.; Gontard, N.; Chalier, P. 2006. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. Journal compilation. The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology, 43: 149-154.
- Aider, M. 2010. Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. LWT - Food Science and Technology, 43: 837-842.
- Angioni, A.; Barra, A.; Coroneo, V.; Dessi, S.; Cabras, P. (2006). Chemical composition, seasonal variability and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54: 4364-4370.
- Arldogan, B. C.; Baydar, H.; Kaya, S.; Dermirci, M.; Özabay, D.; Mumcu, E. 2002. Antimicrobial activity and chemical composition of Some sssential oils. Archives of Pharmacal Research, 25 (6): 860-864.
- Asaolu, M. F.; Oyeyemi, O. A.; Olanlokun, J. O. 2009. Chemical composition, Phytochemical constituents and *in vitro* biological activity of various extracts of *Cymbopogon*. Pakistan Journal of Nutrition, 8 (12): 1920-1922.
- Avoseh, O.; Oyedeji, O.; Rungqu, P.; Nkeh-Chungag, B.; Oyedeji, A. 2015. *Cymbopogon* Species; Ethnopharmacology, Phytochemistry and the Pharmacological Importance". Molecules, 20: 7438-7453.
- Bajpai, V. K.; Rahman, A.; Choi, U. K.; Kang, S. C. 2007. Inhibitory parameters of the essential oil and various extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu to reduce food spoilage and food-borne pathogens. Food Chemistry, 105: 1061-1066.
- Bajpai, V. K.; Baek, K. 2016. Biological efficacy and aplication of essential oils in foods - a review. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 19 (1): 1-19.
- Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils - a review. Food and Chemical Toxicology, 46: 446-475.
- Balouiri, M.; Sadiki, M.; Ibensouda, S. K. 2016. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: a review. Journal of Pharmaceutical Analysis, 6: 71-79.
- Begum, A.; Sandhya S.; Shaffath A. S.; Vinod, K. R.; Reddy, S.; Banji, D. 2013. An indepth review on the medicinal flora *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae). Ata Scientiarum Polonorum. Technologia Alimentaria, 12: 61-73.
- Bona, E. A. M.; Pinto, F. G. S.; Fruet, T. K.; Jorge, T. C. M.; Moura, A. C. 2014. Comparison of methods for evaluation of antimicrobial activity and determination of minimum inhibitory concentration (mic) of aqueous and ethanol plant extracts. Pharmacology, 81 (3): 218-225.
- Burt S, 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. International Journal of Food Microbiology, 94: 223-253.
- Calo, J. R.; Grandall, P. G.; O'Bryan, C. A.; Ricke, S. C. 2015. Essential oils as antimicrobials in food systems - a review. Food Control, 54: 111-119.

Carvalho, R. 2012. Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial *Thymus mastichina*. Relatório de estágio para obtenção do Grau de Mestre em: Ciências Farmacêuticas da Universidade da Beira Interior.

Castilho, P. C.; Savluchinske-Feio, S.; Weinhold, T. S.; Gouveia, S. C. 2012. Evaluation of the antimicrobial and antioxidant activities of essential oils, extracts and their main components from oregano from Madeira Island, Portugal. *Food Control*, 23: 552-558.

Cavanagh, H. M. A.; Wilkinson, J. M. 2005. Lavender essential oil: o review. *Australian Infection Control*, 10: 35-37.

Chi, S.; Zinavic, S.; Penfield, M. P. 2006. Application of chitosan films enriched with Oregano essential oil on Bologna – Active Compounds and Sensory Attributes. *Food Science and Technology International*, 12 (2): 111-117.

Coelho, T. 2015. Estudos de propagação *in vitro*, caracterização e valorização de carqueja. Tese apresentada para obtenção do grau de doutor em: Engenharia Alimentar. Instituto Superior de Agronomia. Universidade de Lisboa.

Cunha, A. P.; Ribeiro, J. A.; Roque, O. R. 2009. Plantas Aromáticas em Portugal-Characterização e Utilizações. 2ª Edição. Fundação Calouste Gulbenkian Lisboa.

Damjanović-Vratnica, B.; Caković, D.; Perović, S. 2015. Composition and antimicrobial studies of essential oil of *Thymus vulgaris* from Montenegro. *Biologica Nyssana*, 6 (2): 67-73.

Delgado, F.; R. Oliveira, A.; González-Coloma, N.; Mohamed, A. C.; Soria, J.; Sanz, J.; Burillo, J.; Rodilla, L.; Silva e M. Reina. 2007. Adaptação ao cultivo e valorização de *Lavandula luisieri*. Poster. In: II Colóquio Nacional de Plantas Aromáticas e Medicinais. Vila das Caldas do Gerês.

Delgado, F. 2010. Conservação e valorização de *Asphodelus bento-rainhae* P.Silva e *Lavandula luisieri* (Rozeira) Rivas -Martínez da Beira Interior. Doutoramento em: Engenharia Agronómica da Universidade Técnica de Lisboa. Instituto Superior de Agronomia.

Domingues, L. I. P. 2015. Qualidade microbiológica e físico-química da água usada na higienização em explorações de leite de pequenos ruminantes. Tese de Mestrado em Inovação e Qualidade na Produção Alimentar. Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco.

El-Fouly, M. Z.; Sharaf, A. M.; Shanin, A. A. M.; El-Bialy, H. A. 2015. Biosynthesis of pyocyanin pigment by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Radiation Research Applied Sciences*, 8: 36-48.

Ferreira, A. R. 2017. Diversidade genética de isolados bacterianos de *Pseudomonas* e géneros afins relacionados com defeitos de cor em queijo. Tese de Mestrado em Inovação e Qualidade na Produção Alimentar. Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco.

Fournomiti, M.; Kimbaris, A.; Mantzourani, I.; Plessas, S.; Theodoridou, I.; Papaemmanouil, V.; Kapsiotis, I.; Panopoulou, M.; Stavropoulou, E.; Bezirtzoglou, E. E.; Alexopoulos, A. 2015. Antimicrobial activity of essential oils of cultivated oregano (*Origanum vulgare*), sage (*Salvia officinalis*), and thyme (*Thymus vulgaris*) against clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, and *Klebsiella pneumoniae*. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 26: 23289.

Franzetti, L.; M, Scarpellini, 2007. Characterisation of *Pseudomonas* spp. isolated from foods. *Annals of Microbiology*, 57 (1): 39-47.

Gavahian, M.; Farahnaky, A.; Javidnia, K.; Majzoobi, M. 2012. Comparison of ohmicassisted hydrodistillation with traditional hydrodistillation for the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 14 (0): 85-91.

González-Coloma, A.; Delgado, F.; Rodilla, J.; Silva, L.; Sanz, J.; Burillo, J. 2011. Chemical and biological profiles of *Lavandula luisieri* essential oils from western Iberia Peninsula populations. Biochemical Systematics and Ecology, 39: 1-8.

Homez-Jara, A.; Daza, L. D.; Aguirre, D. M.; Muñoz, J. A.; Solanilla, J. F.; Váquiro, H. A. 2018. Characterization of chitosan edible films obtained with various polymer concentrations and drying temperatures. International Journal of Biological Macromolecule, 113: 1233-1240.

Hussain, A. I.; Anwar, F.; Chatha, S. A. S.; Jabbar, A.; Mahboob, A.; Nigam, P. S. 2010. *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activitie. Brazilian Journal of Microbiology, 41: 1070-1078.

ISSO/DIS 92:35. 2013. Aromatic Natural Raw Materials-Vocabulary: International Standard Organisation, Geneva.

Jardim Botânico UTAD: <http://jb.utad.pt> (Consultado a 24-10-2018).

Juven, B. J.; Kanner, J.; Schved, F.; Weisslowicz, H. 1994. Factors that interact with the antibacterial action of *thyme* essential oil and its active constituents. Journal of Applied Bacteriology, 76: 626-631.

Khan, A.; Bashir, S.; Khan, S. R.; Gilani, A. H. 2011. Antiuro lithic activity of *Origanum vulgare* is mediated through multiple pathways. BMC Complementary and Alternative Medicine, 11:96.

Khorshidian, N.; Yousefa, M.; Khanniria, E.; Mortazavianc, A. M. 2018. Potential application of essential oils as antimicrobial preservatives in cheese. International Journal of Pharmaceutics, 483: 220-243.

Lang, G., Buchbauer G. 2011. A review on recent research results (2008-2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals – a review. Flavour and Fragrance Journal, 27: 13-39.

Liu, L.; Coenye, T.; Burns, J. L.; Whitby, P. W.; Stull, T. L.; LiPuma, J. J.; 2002. Ribosomal DNA-Directed PCR for Identification of *Achromobacter (Alcaligenes) xylosoxidans* Recovered from Sputum Samples from Cystic Fibrosis Patients. Journal of clinical microbiology, 40 (4):1210-1213.

Macwan, S. R.; Dabhi, B. K.; Aparnathi, K. D.; Prajapati, J. B. 2016. Essential oils of herbs and spices: Their antimicrobial activity and application in preservation of foods. International Journal of Current Microbioly and Applied Sciences, 5 (5): 885-901.

Martins, A. P., Nogueira, M. T., Costa, M. C., Salgueiro, L. 2011. Requisitos de qualidade em óleos essenciais: a importância das monografias da Farmacopeia Europeia e das normas ISO. *Revista de Fitoterapia*, 11 (2): 122-145.

Milde, J.; Elstner, E. F.; Graßmann, J. Synergistic inhibition of low-density lipoprotein oxidation by rutin, γ -terpinene, and ascorbic acid. *Phytomedicine* 11: 105–113.

Miller, K. S.; Krochta, J. M. 1997. Oxygen and aroma barrier properties of edible films: - a review. *Trends in Food Science & Technology*, 8: 228-237.

Morais, L. V. 2018. Estudo dos defeitos de cor em queijos de ovelha e cabra laborados com leite cru. Tese de Mestrado em Inovação e Qualidade na Produção Alimentar. Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco.

Negrelle R.; Gomes E. 2007. *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.: chemical composition and biological activities. *Revista a Brasileira de Plantas Medicinai*s. Botucatu, 9 (1): 80-92.

- Oliveira, A. 2015. Estudo de plantas para potencial aplicação a embalagens alimentares ativas. Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar da Universidade de Coimbra.
- Ortiz, R. S.; Marrero, G. V.; Navarro, A. L. T. 2002. Instructivo técnico para el cultivo de *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf (Caña Santa). Revista Cubana de Plantas Medicinai, 7: 89-95.
- Oussalah, M.; Caillet, S.; Saucier, L.; Lacroix, M. 2005. Inhibitory effects of select plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E.coli* 0157:H7, *Salmonella Typimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. Food Control, 18: 414-420.
- Özkalp, B.; Sevgi, F.; Özcan, M.; Özcan, M. M. 2010. The antibacterial activity or essential oil oregano (*Origanum vulgare* L.). Journal of Food. Agriculture & Environmen, 8 (2): 272-274.
- Peix, A.; Ramírez-Bahena, M.H.; Velázquez, E. 2009. Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*, 9: 132-1147.
- Peix, A.; Ramírez-Bahena, M.H.; Velázquez, E. 2018. The current status on the taxonomy of *Pseudomonas* revisited: An update. Infection , Genetics and Evolution, 57: 106-116.
- Pérez-Gago, M. B.; Krochta, J. M. 2002. Protein based Films and Coatings. CRC Press, 6: 159-180.
- Pérez-Jiménez, J.; Arranz, S.; Taberner, M.; Diaz-Rubio, M.; Serrano, J.; Goñi, I.; Saura-Calixto, F. 2008. Updated Methodology to Determine Antioxidant Capacity in Plant Food, Oils and Beverages: Extraction, Measurement and Expression of Results. Food Research International, 41: 274-285.
- Perferia, A. J. Flora-On: Flora de Portugal Interactiva. 2014. Sociedade Portuguesa de Botânica. www.flora-on.pt. Consulta efectuada em 28-11-2018.
- Pintado, C. M. B. S. 2009. Efeito de bioconservantes no crescimento e sobrevivência de *Listeria monocytogenes* em queijo de ovelha. Doutoramento em: Engenharia Agro-Industrial. Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa.
- Pires, P. 2013. Óleos essenciais de *Melaleuca armillaris* caracterização e atividade antimicrobiana. Relatório de estágio da Licenciatura em Biologia Aplicada. Escola Superior Agrária de Castelo Branco. Instituto Politécnico de Castelo Branco.
- Poblete-Castro, I.; Becker, J.; Dohnt, K.; Santos, V. M.; Wittmann, C. 2012. Industrial biotechnology of *Pseudomonas putida* and related species. Appl Microbiol Biotechnol.
- Porto, M. Flora-On: Flora de Portugal Interactiva. 2014. Sociedade Portuguesa de Botânica. www.flora-on.pt. Consulta efectuada em 28-11-2018.
- Probst, I. S.; Junior, A. F. 2012. Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial
- Ramalho, C. E. Flora-On: Flora de Portugal Interactiva. 2014. Sociedade Portuguesa de Botânica. www.flora-on.pt. Consulta efectuada em 28-11-2018.
- Ramos, M. T. S. 2014. Avaliação da qualidade da água utilizada em explorações de leite de pequenos ruminantes. Relatório do trabalho de fim de curso de licenciatura em Nutrição Humana e Qualidade Alimentar. Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco.
- Russo, M.; Galletti, G.C.; Bocchini, P.; Carnacini, A. 1998. Essential oil chemical composition of wild populations of Italian oregano spice (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart): A preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis: 1. Inflorescences. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46: 3741-3746.
- Sabual, B.; Dan, M.; John, A. J.; Kurup, R.; Pradeep, N. S.; Valsamma, R. K.; George, V. 2006. Caryophyllene-rich rhizome oil of *Zingiber nimmonii* from South India: Chemical characterization and antimicrobial activity. Phytochemistry, 67: 2469-2473.

- Samadi, M.; Abidin, Z, Z.; Yunus, R.; Biak, D, R, A.; Yoshida, H.; Lok, E, H. 2016. Assessing the kinetic model of hydro-distillation and chemical composition of *Aquilaria malaccensis* leaves essential oil. Chinese Journal of Chemical Engineering, 25 (2): 1004-9541.
- Santos, F.A.; Rao, V. 2000. Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. Phytotherapy Research, 14: 240-244.
- Senatore, F. 1996. Influence of harvesting time on yield and composition of the essential oil of a thyme (*Thymus pulegioides* L.) growing wild in Campania (Southern Italy). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44: 1327-1332.
- Shahidi, F.; Arachchi, J. K. V.; Jeon, Y. J. 1999. Food applications of chitin and chitosans. Food Science & Technology, 10: 37-51.
- Silva, C. J. 2007. Morfoanatomia foliar e composição química dos óleos essenciais de sete espécies de *Melaleuca* L. (*Myrtaceae*). Dissertação do programa de Pós-Graduação em Botânica. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.
- Singh, M., Govindarajan, R., Nath, V., Rawat, A. e Mehrotra, S. 2006. Antimicrobial, wound healing and antioxidant activity of *Plagioclasma appendiculatum* Lehm. et Lind. Journal of Ethnopharmacology, 107: 67-72.
- Sivropoulou, A.; Papanikolaou, E.; Nikolaou, C.; Kokkini, S.; Lanaras, T.; Arsenakis, M. 1996. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44: 1202-1205.
- Stellato, G.; Voorhis, A.; Angelis, M. D.; Eren, A. M.; Ercolini, D. 2017. A few *Pseudomonas* oligotypes dominate in the meat and dairy processing environment. Frontiers in Microbiology, 8: 264.
- Song, X.; Zuoa, G.; Chen, F. 2018. Effect of essential oil and surfactant on the physical and antimicrobial properties of corn and wheat starch films. International Journal of Biological Macromolecules, 107: 1302-1309.
- Southwell, I.; Lowe, R. 2006. Tea tree - The Genus *Melaleuca*. Wollongbar Agricultural Institute, Australia. Taylor & Francis e-Library.
- Szumny, A; Figiel, A.; Gutiérrez-Ortiz, A.; Carbonell-Barrachina, A. A. 2010. Composition of rosemary essential oil (*Rosmarinus officinalis*) as affected by drying method. Journal of Food Engineering, 97: 253-260.
- Tavares A.; Zuzarte M.; Salgueiro L. 2010. Plantas - Aromáticas e Medicinais. Escola Médica do Jardim Botânico da Universidade de Coimbra.
- Teixeira, B.; Marques, A.; Ramos, C.; Serrano, C; Matos, O.; Neng, N. R.; Nogueira, J. M. F.; Saraiva, J. A.; Nunes, M. L. 2013. Chemical composition and bioactivity of different oregano (*Origanum vulgare*) extracts and essential oil. Journal of the Science of Food and Agriculture, 93: 2707-2714.
- Tena, D.; Fernández, C.; Lago, M. R. 2015. *Alcaligenes faecalis*: an unusual cause of skin and soft tissue infection. Japanese Journal of Infectious Diseases, 68: 128-130.
- Uraku, A. J. 2015. Determination of Chemical Compositions of *Cymbopogon citratus* Leaves by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) method. Research Journal of Phytochemistry, 9 (4): 175-187.
- Vargas, M., Albors, A.; Chiralt, A.; González-Martínez, C. 2009. Characterization of chitosan-oleic acid composite films. Food Hydrocolloids, 23 (2): 536-547.
- Zivanovic, S.; Chi, S.; Draughon, A. F. 2005. Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. Journal of food science, 70 (1).

Zuzarte, M.; Gonçalves, M. J.; Cruz, M. T.; Cavaleiro, C.; Canhoto, J.; Vaz, Z.; Pinto, E.; Salgueiro, L. *Lavandula luisieri* essential oil as a source of antifungal drugs. *Food chemistry*, 135 (1): 1505-15010.

WHO. 2009. WHO Monographs on Selected Medicinal Plants. Geneva: World Health Organization, 456.

Wittmann, J.; Dreiseikelmann, B.; Rohde, C.; Rohde, M.; Sikorski, J. 2014. Isolation and Characterization of Numerous Novel Phages Targeting Diverse Strains of the Ubiquitous and Opportunistic Pathogen *Achromobacter xylosoxidans*. *Plos One*, 9 (1): 86-935.

VII. Anexos

Anexo 1 - Concentração mínima inibitória (MIC)

Tabela 1 - Concentração mínima microbicida (MIC; %, v/v) de diferentes óleos essenciais sobre a multiplicação de diferentes culturas bacterianas do género *Pseudomonas* e géneros afins.

Ref ^a Microrganismos	Óleos essenciais			
	OEP	OR	OO	OTBL
2	0,168	4,49	***	8,69
	0,084		***	(--)
7	0,084	1,204	***	2,324
9	8,69	0,63	2,324	0,63
			0,63	(--)
27	8,69	8,69	***	>8,69
29	0,33	4,49	2,324	8,69
67	0,168	-	***	(--)
132	(--)	2,324	***	0,63
137	0,63	(--)	***	(--)
153	(-)	>8,69	***	2,324
184	(-)	-	***	2,324
191	(--)	***	***	1,204

Legenda: (-): Cor não conclusiva; (--) sem inibição; *** - não havia óleo; 2 - *Pseudomonas fluorescens*; 7 - *Alcaligenes faecalis*; 9 - *Achromobacter xylosoxidans*; 27 - *Pseudomonas putida*; 29 - *Pseudomonas putida*; 67 - *Pseudomonas fluorescens*; 132 - *Achromobacter xylosoxidans*; 137 - *Pseudomonas fluorescens*; 153 - *Pseudomonas fluorescens*; 184 - *Pseudomonas putida*; 191 - *Pseudomonas putida*; OEP - óleo essencial de *Cymbogopon citratus*; OR- óleo essencial de *Lavandula luisieri*; OO - óleo essencial de *Origanum vulgare*; OTBL- óleo essencial de *Thymus mastichina*

Tabela 2 - Concentração mínima inibitória (MIC) de diferentes extratos de plantas sobre a multiplicação de diferentes culturas bacterianas do género *Pseudomonas* e géneros afins (%) Óleos da escola (OO e OEP)

Ref ^a Microrganismos	Extratos aquosos			
	EEP	ER	EO	ETBL
2	(--)	>8,69	(--)	>8,69
7	(--)	>8,69	(--)	>8,69
9	(--)	(-)	(--)	>8,69
27	(--)	>8,69	(--)	(--)
29	(--)	>8,69	(--)	8,69
67	(--)	(--)	(--)	(--)
132	8,69	8,69	2,324	>8,69
137	(--)	(--)	(--)	(--)
153	(--)	(--)	(--)	(--)
184	(--)	(--)	(--)	(--)
191	(--)	(--)	(--)	(--)

Legenda: (--) Sem inibição; 2 - *Pseudomonas fluorescens*; 7 - *Alcaligenes faecalis*; 9 - *Achromobacter xylosoxidans*; 27 - *Pseudomonas putida*; 29 - *Pseudomonas putida*; 67 - *Pseudomonas fluorescens*; 132 - *Achromobacter xylosoxidans*; 137 - *Pseudomonas fluorescens*; 153 - *Pseudomonas fluorescens*; 184 - *Pseudomonas putida*; 191 - *Pseudomonas putida*; EEP- extrato aquoso de *Cymbogopon citratus*; ER- extrato aquoso de *Lavandula luisieri*; EO - extrato aquoso de *Origanum vulgare*; ET- extrato aquoso de *Thymus mastichina*.

Anexo 2 - Concentração mínima bactericida (MBC)

Tabela 3 - Concentração mínima bactericida (MBC; %, v/v) de diferentes óleos essenciais sobre a multiplicação de diferentes culturas bacterianas do género *Pseudomonas* e géneros e afins.

Ref ^a Microorganismos	Óleos essenciais			
	OEP	OR	OO	OTBL
2	0,035	8,69	***	8,69
7	0,084 0,168	2,324	***	4,49
9	0,168	1,204	4,49 2,324	1,204
27	4,49	8,69	4,49 2,324	>8,69
29	0,63 0,33	4,49	***	>8,69
67	0,168	-	***	(--)
132	(--)	2,324	***	1,204
137	0,63	-	***	-
153	1,204 0,63	>8,69	*** ***	2,324
184	0,168 0,33	2,324	*** ***	(--) 1,204
191	(--)		***	

Legenda: (--) Sem inibição; ***- Não efetuado; 2 - *Pseudomonas fluorescens*; 7 - *Alcaligenes faecalis*; 9 - *Achromobacter xylosoxidans*; 27 - *Pseudomonas putida*; 29 - *Pseudomonas putida*; 67 - *Pseudomonas fluorescens*; 132 - *Achromobacter xylosoxidans*; 137 - *Pseudomonas fluorescens*; 153 - *Pseudomonas fluorescens*; 184 - *Pseudomonas putida*; 191 - *Pseudomonas putida*; OEP- óleo essencial de *Cymbogopon citratus*; OR- óleo essencial de *Lavandula luisieri*; OO- óleo essencial de *Origanum vulgare*; OTBL- óleo essencial de *Thymus mastichina*.

Tabela 4 - Concentração mínima bactericida (MBC; %, v/v) de diferentes extratos essenciais sobre a multiplicação de diferentes culturas bacterianas do género *Pseudomonas* e géneros afins.

Ref ^a Microorganismos	Extratos aquosos			
	EEP	ER	EO	ETBL
2	-	>8,69	-	>8,69
7	-	>8,69	-	>8,69
9	-	>8,69	-	>8,69
27	-	>8,69	-	-
29	-	>8,69	-	-
67	-	-	-	-
132	>8,69	>8,69	>8,69	>8,69
137	-	-	-	-
153	-	-	-	-
184	-	-	-	-
191	-	-	-	-

Legenda: (--) Sem inibição; 2 - *Pseudomonas fluorescens*; 7 - *Alcaligenes faecalis*; 9 - *Achromobacter xylosoxidans*; 27 - *Pseudomonas putida*; 29 - *Pseudomonas putida*; 67 - *Pseudomonas fluorescens*; 132 - *Achromobacter xylosoxidans*; 137 - *Pseudomonas fluorescens*; 153 - *Pseudomonas fluorescens*; 184 - *Pseudomonas putida*; 191 - *Pseudomonas putida*; EEP- óleo essencial de *Cymbogopon citratus*; ER- extrato aquoso *Lavandula luisieri*; EO - extrato aquoso de *Origanum vulgare*; ETBL- extrato aquoso *Thymus mastichina*

Anexo 3 - Características das formulações dos filmes estudados

Tabela 5 - Resultados das formulações dos filmes efetuados

Tipo de Formulações	Aspeto visual (após secagem)	Propriedades mecânicas)
WPI 1% +ácido acético 3%		
WPI	-	Não dá para tirar conclusões (quebrado)
WPI + G1	Coloração amarela, pegajoso e heterogéneo	Muita elasticidade ao esticar parte; Revestimento fino
WPI + G2	Transparente mas pegajoso	Ao cortar fica agarrado ao bisturi
WPI + óleo	-	Não dá para tirar conclusões (tudo quebrado)
WPI + óleo + G1	-	Não dá para tirar conclusões (tudo quebrado)
WPI + óleo + G2	Heterogéneo e pegajoso	Ao cortar fica agarrado ao bisturi
WPI + Tween 20	-	Não dá para tirar conclusões (quebrado)
WPI + Tween 20 + óleo	Coloração amarela e heterogéneo	Rígido
WPI + Tween 20 + óleo + G1	Opaco, heterogéneo e pegajoso	Ao cortar o revestimento fica agarrado ao bisturi
WPI + Tween 20 + óleo + G2	Heterogéneo e pegajoso	Fino (Parte com facilidade)
WPI + G1 + CMC	Opaco e muito fino	Ao cortar o revestimento parte
WPI + G2 + CMC	Algumas bolhas, pegajoso e opacas	Ao cortar fica agarrado ao bisturi
WPI + G1 + MC	Algumas estrias, formou uma bolha de espuma e pegajoso	Ao cortar fica agarrado ao bisturi
WPI + G2 + MC	Algumas estrias, formou uma bolha de espuma e pegajoso	Ao cortar fica agarrado ao bisturi
WPI 1% +ácido acético 3% / Ch 1% +ácido acético 3%		
WPI + Ch	Opaco mas homogéneo	Rígido (Difícil de cortar)
WPI + Ch +G1	Coloração amarela, heterogéneo	Fino (Parte com facilidade)
WPI + Ch + G2	Coloração amarela, heterogéneo	Tem boa elasticidade
WPI + Ch + Óleo	Homogéneo, mas opaco	Rígido (Difícil de cortar)
WPI + Ch + Óleo + G1	Coloração amarela, homogéneo	Fino (Parte com facilidade)
WPI + Ch + Óleo + G2	Coloração amarela, heterogéneo	Rígido e não tem muita elasticidade
WPI + Ch + Óleo + G1 + Tween 20	Coloração amarela e pegajoso	Ao cortar fica agarrado ao bisturi
WPI + Ch + G2 +Tween 20	Coloração amarela, heterogéneo e muito pegajoso	Fino(Parte com facilidade)

Legenda: WPI- Isolado proteico de soro de leite; Ch- quitosano; G1- glicerol 2%; G2- glicerol 4%.