



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Mecanismos de Ação Antimicrobiana de Óleos Essenciais de Plantas Condimentares de Família *Lamiaceae* |

Marisa Alexandra Viegas Guerreiro |

Orientação | Prof^a Doutora Maria do Rosário Martins

Prof^a Doutora Ana Teresa Caldeira

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Évora, 2018



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Mecanismos de Ação Antimicrobiana de Óleos Essenciais de Plantas Condimentares de Família *Lamiaceae* |

Marisa Alexandra Viegas Guerreiro |

Orientação | Prof^a Doutora Maria do Rosário Martins

Prof^a Doutora Ana Teresa Caldeira

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Évora, 2018

Agradecimentos

Às Prof^a Doutora Maria do Rosário Martins e Prof^a Doutora Ana Teresa Caldeira pela orientação, apoio, ajuda e amizade ao longo da realização deste trabalho.

À Dra Fátima Candeias pelo auxílio prestado nos ensaios de manipulação animal.

À Mestre Andreia Piçarra, um especial agradecimento pela inesgotável paciência e capacidade de motivação, carinho, amizade e apoio incondicional ao longo deste percurso.

Às técnicas de laboratório D. Jesuína Mósca, Anabela Cabeça, D. Esperança Alves, Deolinda Varela e D. Maria Helena Carvalho pela disponibilidade e amizade.

Ao Departamento de Química da Universidade de Évora pela disponibilização dos reagentes e equipamentos necessários ao longo deste estudo.

Ao Laboratório HERCULES - Herança Cultural Estudos e Salvaguarda e ao Projeto HIT3CH – *HERCULES Interface for Technology Transfer and Teaming in Cultural Heritage* - ALT20-03-0246-FEDER-000004 pela disponibilização dos reagentes e equipamentos necessários ao longo deste estudo.

Ao Laboratório Flaviano Gusmão, Lda (SynLab, Évora) pela cedência dos isolados clínicos bacterianos.

A todos os meus colegas e amigos que de alguma forma estiveram presentes ao longo deste estudo e contribuíram para que todas as barreiras fossem mais facilmente ultrapassadas. Quero agradecer em especial à Dra Fani Bexiga, à Doutora Cátia Salvador e à Mestre Sílvia Arantes, pelo apoio e conhecimento ao longo deste trabalho.

A toda a minha família por todo o apoio e carinho imprescindível durante todos estes anos. O meu profundo agradecimento à minha Mãe por todos os sacrifícios suportados para que tudo fosse possível. Um especial agradecimento aos meus avós Georgina e José António pelo exemplo de força e coragem, por todos os dias fazerem de mim uma pessoa melhor.

Ao meu namorado, por ter caminhado ao meu lado sem nunca duvidar, por todo o apoio e paciência ao longo desta aventura.

Muito Obrigada

Abreviaturas

ATCC – Coleção Americana de Culturas, do inglês *American Type Culture Collection*

BSA – albumina de soro de bovino, do inglês *bovine serum albumin*

CL₅₀ – concentração letal para 50 % da população

CMB – concentração mínima bactericida

CMI – concentração mínima inibitória

DL₅₀ – dose letal para 50 % da população

DMSO – dimetilsulfóxido, do inglês *dimethyl sulfoxide*

FIC – concentração inibitória fracionada, do inglês *fractional inhibitory concentration*

FID – detetor de ionização de chama, do inglês *flame ionization detector*

GC – cromatografia gasosa, do inglês *gas chromatography*

INT – *p*-iodonitrotetrazólio

INTF – iodonitrotetrazólio-formazão

IPP – pirofosfato de isopentenilo, do inglês *isopentenyl pyrophosphate*

IPP² – difosfato de isopentenilo, do inglês *isopentenyl diphosphate*

IR – índice de retenção

MEP – via metabólica do metileritritol fosfato, do inglês *methylerythritol 4-phosphate pathway*

MHA – Meio de cultura sólido de *Mueller Hinton*, do inglês *Mueller Hinton Agar*

MHB – Meio de cultura líquido de *Mueller Hinton*, do inglês *Mueller Hinton Broth*

MRSA – *Staphylococcus aureus* multiresistente, do inglês *Multiple-resistant Staphylococcus aureus*

NA – Meio de agar nutritivo, do inglês *nutrient agar*

NAD – dinucleótido de nicotinamida e adenina, do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide*

NADP – fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina, do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*

NCCLS – Comité Nacional para Padrões de Laboratório Clínico, do inglês *National Committee for Clinical Laboratory Standards*

OECD – Organização para a Economia Cooperação e Desenvolvimento, do inglês *Organisation for Economic Co-operation and Development*

OE – óleo essencial

PAM – planta aromática medicinal

PBS – tampão fosfato-salino, do inglês *phosphate-buffered saline*

PI – iodeto de propídio, do inglês *propidium iodide*

PS – fosfatidilserina, do inglês *phosphatidylserine*

TE – tetraciclina

TE-Cl – cloridrato de tetraciclina

UFC – unidades formadoras de colónias

VRE – *Enterococcus* resistente à vancomicina, do inglês *vancomycin-resistant Enterococcus*

WHO – Organização mundial da saúde, do inglês *World Health Organization*

Resumo

Mecanismos de Ação Antimicrobiana de Óleos Essenciais de Plantas Condimentares de Família *Lamiaceae*

No presente estudo procedeu-se à caracterização química e avaliação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais de sete espécies de plantas aromáticas autóctones da região do Alentejo, nomeadamente: *Calamintha nepeta*, *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri*, *Lavandula pedunculata*, *Lavandula viridis*, *Mentha pulegium*, *Mentha spicata* e *Origanum vulgare* subsp. *virens*.

Os óleos essenciais em estudo apresentaram uma composição química diversificada, rica em monoterpenos oxigenados e revelaram um largo espectro de ação antimicrobiana, com capacidade inibitória do crescimento bacteriano de estirpes gram-positivas e gram-negativas. Observou-se também o efeito sinérgico e/ou aditivo de misturas de dois óleos essenciais com elevada diminuição dos valores de concentração mínima inibitória. As misturas de óleos essenciais mais promissoras foram as de *C. nepeta/L. pedunculata*, *C. nepeta/M. spicata* e *L. pedunculata/M. pulegium*, as quais apenas não demonstraram efeito sinérgico face a uma estirpe bacteriana. Os óleos essenciais estudados apresentaram alta toxicidade face a *Artemia salina*, com valores de CL₅₀ compreendidos entre 35,0 e 213,6 mg/mL e baixa toxicidade quando administrados por via oral a murganhos (DL₅₀ > 2000 mg/kg).

O elevado potencial antimicrobiano dos óleos essenciais das plantas aromáticas condimentares em estudo sugere a sua potencial aplicação na indústria alimentar como preservantes de alimentos bem como nutracêuticos e o seu estudo na indústria farmacêutica, no sentido de avaliar a sua toxicidade para mamíferos e definir a dose terapêutica segura.

Palavras-chave: Plantas aromáticas condimentares, óleos essenciais, atividade antimicrobiana, composição química, efeito sinérgico.

Abstract

Mechanisms of Antimicrobial Action of Essential Oils of Condiment Plants of *Lamiaceae* Family

In the present study the chemical characterization and evaluation of the antimicrobial activity of essential oils of seven species of autochthonous aromatic plants of the Alentejo region was performed, namely: *Calamintha nepeta*, *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri*, *Lavandula pedunculata*, *Lavandula viridis*, *Mentha pulegium*, *Mentha spicata* and *Origanum vulgare* subsp. *virens*.

Essential oils presented diverse chemical composition, rich in oxygenated monoterpenes and revealed a broad spectrum of antimicrobial action, with inhibitory capacity for bacterial growth of gram-positive and gram-negative strains. The synergistic and/or additive effect of mixtures of two essential essential oils was also observed, with a high decrease in the minimum inhibitory concentration values. The most promising essential oils mixtures were *C. nepeta/L. pedunculata*, *C. nepeta/M. spicata* and *L. pedunculata/M. pulegium*, which only showed no synergistic effect against one bacterial strain. Essential oils studied presented high toxicity to *Artemia salina*, with LC₅₀ values between 35.0 and 213.6 mg/mL and low toxicity when administrated orally to mice (LD₅₀ > 2000 mg/kg).

The high antimicrobial potential of the essential oils of the spice aromatic plants under study suggests their potential application in the food industry as food preservatives as well as nutraceuticals and their study in the pharmaceutical industry, in order to assess their toxicity to mammals and to define the safe therapeutic dose.

Keywords: Flavouring aromatic plants, essential oils, antimicrobial activity, chemical composition, synergistic effect.

Índice

1. Problemática.....	1
2. Objetivos.....	2
2.1. Objetivo geral	2
2.2. Objetivos específicos.....	2
3. Introdução.....	4
3.1. Plantas aromáticas medicinais.....	4
3.2. Processos metabólicos nas plantas	4
3.3. Óleos essenciais	6
3.4. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais	7
3.5. Sinergismo entre os óleos essenciais.....	8
3.6. Estirpes bacterianas patogênicas resistentes	11
3.7. Avaliação da viabilidade celular	14
3.8. Plantas aromáticas medicinais em estudo	15
4. Materiais e métodos	20
4.1. Seleção e preparação das plantas.....	20
4.2. Reagentes	20
4.3. Extração dos óleos essenciais.....	21
4.4. Determinação do índice de refração	21
4.5. Análise da composição química dos óleos essenciais por cromatografia gasosa (GC).....	21
4.6. Avaliação da atividade antimicrobiana	22
4.6.1. Preparação das suspensões microbianas	23
4.6.2. Ensaio de difusão em meio sólido.....	23
4.6.3. Ensaio em meio líquido.....	24
4.6.4. Avaliação do efeito sinérgico dos óleos essenciais.....	26
4.6.5. Avaliação do efeito dos óleos essenciais nas culturas bacterianas em citometria de fluxo.....	26
4.7. Avaliação da letalidade em <i>Artemia salina</i>	27
4.8. Avaliação da toxicidade “ <i>in vivo</i> ”	28
5. Resultados e discussão	29
5.1. Caracterização química dos óleos essenciais.....	29
5.2. Avaliação da sensibilidade microbiana	37
5.3. Determinação da concentração mínima inibitória e concentração mínima bactericida.....	39

5.4.	Avaliação do efeito sinérgico das misturas de OEs.....	45
5.5.	Avaliação do potencial bactericida das misturas	55
5.6.	Avaliação da viabilidade celular por citometria de fluxo	55
5.7.	Avaliação da letalidade em <i>Artemia salina</i>	59
5.8.	Avaliação da toxicidade “ <i>in vivo</i> ”.....	60
6.	Conclusões e perspectivas futuras	62
7.	Referências bibliográficas	65
8.	Anexos	81

Índice de figuras

Figura 1 Esquema simplificado das vias metabólicas de biossíntese das três principais classes de compostos bioativos presentes nas plantas aromáticas medicinais.	5
Figura 2 Esquemática dos mecanismos de ação dos óleos essenciais na célula bacteriana.....	8
Figura 3 <i>Calamintha nepeta</i> (L.) Savi, Herdade da Mitra, Évora.....	16
Figura 4 <i>Lavandula stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i> (Rozeira), Herdade da Mitra, Évora.	16
Figura 5 <i>Lavandula pedunculata</i> subsp. <i>pedunculata</i> (Mill.) (Cav.).	17
Figura 6 <i>Lavandula viridis</i> L'Hér.	17
Figura 7 <i>Mentha pulegium</i> L.....	18
Figura 8 <i>Mentha spicata</i> L.....	18
Figura 9 <i>Origanum vulgare</i> subsp. <i>virens</i> (Hoffmans & Link) Bonnier & Layens, Herdade da Mitra, Évora.	19
Figura 10 Reação de redução do INT a INTF na presença de desidrogenases viáveis.	25
Figura 12 Valores de concentração mínima inibitória (CMI) obtidos para as misturas entre o OE de <i>C. nepeta</i> e OEs de género <i>Lavandula</i> , face às estirpes microbianas testadas, representados em µL/mL.....	46
Figura 13 Valores de concentração mínima inibitória (CMI) obtidos para as misturas entre o OE de <i>C. nepeta</i> e OEs de género <i>Mentha</i> , face às estirpes microbianas testadas, representados em µL/mL.....	47
Figura 14 Valores de concentração mínima inibitória (CMI) obtidos para as misturas entre o OE de <i>C. nepeta</i> e o OE de <i>O. vulgare</i> , face às estirpes microbianas testadas, representados em µL/mL.	49
Figura 15 Valores de concentração mínima inibitória (CMI) obtidos para as misturas entre o OE de <i>L. pedunculata</i> e o OE de <i>L. viridis</i> , face às estirpes microbianas testadas, representados em µL/mL.	50
Figura 16 Valores de concentração mínima inibitória (CMI) obtidos para as misturas entre os OEs de género <i>Lavandula</i> e os OEs de género <i>Mentha</i> , face às estirpes microbianas testadas, representados em µL/mL.....	51

Figura 17 Valores de concentração mínima inibitória (CMI) obtidos para as misturas entre os OEs de género <i>Mentha</i> , face às estirpes microbianas testadas, representados em µL/mL.....	52
Figura 18 Valores de índice de concentração inibitória fracionada (FIC) obtidos nas diversas misturas de óleos essenciais (OEs) face às estirpes bacterianas.	54
Figura 19 Resultados relativos à concentração de mistura mais baixa testada, obtidos por citometria de fluxo e microscopia de epifluorescência.	57
Figura 20 Curvas dose-resposta obtidas nos ensaios de letalidade em <i>Artemia salina</i>	59
Figura 21 Determinação do controlo positivo, em ensaio de citometria de fluxo, recorrendo ao tamanho celular da amostra.....	89
Figura 22 Avaliação da viabilidade celular em citometria de fluxo da mistura <i>C. nepeta/L. pedunculata</i> face à estirpe <i>E. faecalis</i> ATCC 29212.	90
Figura 23 Avaliação da viabilidade celular em microscopia de epifluorescência da mistura <i>C. nepeta/L. pedunculata</i> face à estirpe <i>E. faecalis</i> ATCC 29212.....	91
Figura 24 Avaliação da viabilidade celular em citometria de fluxo da mistura <i>C. nepeta/L. pedunculata</i> face à estirpe <i>S. aureus</i> LFG 1007.	92
Figura 25 Avaliação da viabilidade celular em microscopia de epifluorescência da mistura <i>C. nepeta/L. pedunculata</i> face à estirpe <i>S. aureus</i> LFG 1007.	93
Figura 26 Avaliação da viabilidade celular em citometria de fluxo da mistura <i>C. nepeta/L. pedunculata</i> face à estirpe <i>E. coli</i> LFG 1003.....	94
Figura 27 Avaliação da viabilidade celular em microscopia de epifluorescência da mistura <i>C. nepeta/L. pedunculata</i> face à estirpe <i>E. coli</i> LFG 1003.....	95
Figura 28 Avaliação da viabilidade celular em citometria de fluxo da mistura <i>C. nepeta/L. pedunculata</i> face à estirpe <i>P. aeruginosa</i> LFG 1002.....	96
Figura 29 Avaliação da viabilidade celular em microscopia de epifluorescência da mistura <i>C. nepeta/L. pedunculata</i> face à estirpe <i>P. aeruginosa</i> LFG 1002.....	97

Índice de tabelas

Tabela 1 Interpretação do índice FIC segundo diferentes estudos realizados sobre o efeito sinérgico entre óleos essenciais e/ou compostos isolados de óleos essenciais.	10
Tabela 2 Descrição taxonómica das plantas aromáticas em estudo: <i>Calamintha nepeta</i> (L.) Savi, <i>Lavandula stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i> (Rozeira), <i>Lavandula pedunculata</i> (Mill.) (Cav.), <i>Lavandula viridis</i> L'Hér, <i>Mentha pulegium</i> L., <i>Mentha spicata</i> L. e <i>Origanum vulgare</i> subsp. <i>virens</i> (Hoffmans & Link) Bonnier & Layens.	15
Tabela 3 Local e época de colheita das plantas aromáticas medicinais em estudo.	20
Tabela 4 Valores de rendimento de extração, massa volúmica e índice de refração dos óleos essenciais em estudo.	29
Tabela 5 Grupos de componentes químicos obtidos nos óleos essenciais de <i>C. nepeta</i> , <i>M. pulegium</i> , <i>M. spicata</i> e <i>O. vulgare</i>	30
Tabela 6 Grupos de componentes químicos obtidos nos óleos essenciais de <i>L. luisieri</i> , <i>L. pedunculata</i> e <i>L. viridis</i>	30
Tabela 7 Caracterização química dos óleos essenciais de <i>C. nepeta</i> , <i>M. pulegium</i> , <i>M. spicata</i> e <i>O. vulgare</i> por GC-FID.	31
Tabela 8 Caracterização química dos óleos essenciais de <i>L. luisieri</i> , <i>L. pedunculata</i> e <i>L. viridis</i> por GC-FID.	35
Tabela 9 Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais e antimicrobiano padrão cloridrato de tetraciclina (TE-CI) face a estirpes bacterianas, representada por halos de inibição (mm).	38
Tabela 10 Valores de concentração mínima inibitória (CMI) obtidos para os óleos essenciais (OEs) e para o antimicrobiano padrão cloridrato de tetraciclina (TE-CI) testados, face a estirpes bacterianas patogénicas.	40
Tabela 11 Valores de concentração mínima bactericida (CMB) obtidos para os óleos essenciais (OEs) e para o antibiótico padrão (TE-CI) testados, face a estirpes bacterianas patogénicas.	44
Tabela 12 Valores de índice de concentração inibitória fracionada (FIC) e interação entre os óleos essenciais de <i>L. pedunculata</i> e <i>L. viridis</i>	50
Tabela 13 Valores de DL ₅₀ relativos aos óleos essenciais em estudo obtidos em ensaios em ratinhos <i>Swiss</i>	61

Tabela 14 Valores de índice de concentração inibitória fracionada (FIC) e interação entre os óleos essenciais, do género <i>Lavandula</i> e de <i>C. nepeta</i>	81
Tabela 15 Valores de índice de concentração inibitória fracionada (FIC) e interação entre os óleos essenciais, do género <i>Mentha</i> e de <i>C. nepeta</i>	82
Tabela 16 Valores de índice de concentração inibitória fracionada (FIC) e interação entre os óleos essenciais de <i>C. nepeta</i> e <i>O. vulgare</i>	82
Tabela 17 Valores de índice de concentração inibitória fracionada (FIC) e interação entre os óleos essenciais de <i>L. pedunculata</i> e <i>L. viridis</i>	83
Tabela 18 Valores de índice de concentração inibitória fracionada (FIC) e interação entre os óleos essenciais de género <i>Lavandula</i> e de género <i>Mentha</i>	83
Tabela 19 Valores de índice de concentração inibitória fracionada (FIC) e interação entre os óleos essenciais de género <i>Mentha</i>	84
Tabela 20 Valores de concentração mínima bactericida (CMB), representados em $\mu\text{L}/\text{mL}$, obtidos para as misturas do OE de <i>C. nepeta</i> com OEs de género <i>Lavandula</i> face às estirpes bacterianas testadas.	85
Tabela 21 Valores de concentração mínima bactericida (CMB), representados em $\mu\text{L}/\text{mL}$, obtidos para as misturas do OE de <i>C. nepeta</i> com OEs de género <i>Mentha</i> face às estirpes bacterianas testadas.	86
Tabela 22 Valores de concentração mínima bactericida (CMB), representados em $\mu\text{L}/\text{mL}$, obtidos para a mistura do OE de <i>C. nepeta</i> com o OE de <i>O. vulgare</i> face às estirpes bacterianas testadas.	86
Tabela 23 Valores de concentração mínima bactericida (CMB), representados em $\mu\text{L}/\text{mL}$, obtidos para a mistura do OE de <i>L. pedunculata</i> com o OE de <i>L. viridis</i> face às estirpes bacterianas testadas.	87
Tabela 24 Valores de concentração mínima bactericida (CMB), representados em $\mu\text{L}/\text{mL}$, obtidos para a mistura de OEs de género <i>Lavandula</i> com OEs de género <i>Mentha</i> face às estirpes bacterianas testadas.	87
Tabela 25 Valores de concentração mínima bactericida (CMB), representados em $\mu\text{L}/\text{mL}$, obtidos para a mistura de OEs de género <i>Mentha</i> face às estirpes bacterianas testadas.	88
Tabela 26 Avaliação da viabilidade celular da mistura <i>C. nepeta/L. pedunculata</i> , face à estirpe <i>E. faecalis</i> ATCC 29212.	90
Tabela 27 Avaliação da viabilidade celular da mistura <i>C. nepeta/L. pedunculata</i> , face à estirpe <i>S. aureus</i> LFG 1007.	92
Tabela 28 Avaliação da viabilidade celular da mistura <i>C. nepeta/L. pedunculata</i> , face à estirpe <i>E. coli</i> LFG 1003.	94

Tabela 29 Avaliação da viabilidade celular da mistura *C. nepeta*/L. *pedunculata*, face à estirpe *P. aeruginosa* LFG 1002. 96

Tabela 30 Valores de CL₅₀ obtidos para os óleos essenciais e o controlo positivo nos ensaios de letalidade de *Artemia Salina*. 98

1. Problemática

As plantas aromáticas medicinais são uma fonte de compostos bioativos, provenientes do seu metabolismo secundário, a maioria com atividade farmacológica relevante e toxicidade reduzida para os mamíferos quando comparados com os fármacos de síntese (Bakkali *et al.*, 2008; Bernhoft, 2010). A composição química complexa dos óleos essenciais confere-lhes propriedades antimicrobianas únicas, caracterizadas pela utilização de diversos mecanismos de ação em simultâneo, evitando o *quorum sensing* bacteriano e resistência microbiana (Nazzaro *et al.*, 2013).

Perante o crescente número de bactérias patogénicas resistentes a fármacos obtidos por síntese química, tem aumentado o interesse na utilização de fármacos de origem natural que não provoquem mecanismos de resistência bacteriana. Esta problemática tem desenvolvido um crescente impacto a nível social e económico, o que leva à investigação de novos princípios ativos e de formulações eficazes no combate de microrganismos resistentes, sendo esta uma prioridade ao nível mundial (Tacconelli *et al.*, 2017).

Os óleos essenciais constituem uma alternativa na terapêutica de patologias infetocontagiosas. As misturas de óleos essenciais pode resultar na aquisição de novas características, conseqüente do efeito sinérgico entre os mesmos. Assim, é possível estabelecer formulações de misturas de óleos essenciais eficazes a uma elevada gama de microrganismos patogénicos (Bassolé & Juliani, 2012; Espina *et al.*, 2013)

O Alentejo é uma região extremamente rica em plantas aromáticas, muitas das quais utilizadas pela população local como condimentos alimentares, assim como na prática tradicional para a prevenção e tratamento de algumas patologias causadas por microrganismos. Face ao exposto, e tendo em consideração a diversidade quimiotipos de óleos essenciais relativamente às diferentes espécies de plantas aromáticas e à distribuição geográfica das mesmas, neste estudo selecionaram-se sete espécies de plantas aromáticas medicinais da família *Lamiaceae*, nomeadamente, *Calamintha nepeta*, *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri*, *Lavandula pedunculata*, *Lavandula viridis*, *Mentha pulegium*, *Mentha spicata* e *Origanum vulgare* subsp. *virens*. Neste estudo, pretendeu-se avaliar o seu potencial antimicrobiano de modo a valorizar o potencial de aplicação fitoterapêutico destas plantas frequentemente usadas como plantas condimentares na Dieta Mediterrânica e validar cientificamente as propriedades medicinais destes óleos essenciais, com vista à sua futura aplicação como agentes nutracêuticos e/ou fitoterapêuticos.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo principal a caracterização química e a avaliação do potencial antimicrobiano de óleos essenciais de plantas aromáticas autóctones do Alentejo, nomeadamente, *Calamintha nepeta* (L.) Savi, *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri* (Rozeira), *Lavandula pedunculata* subsp. *pedunculata* (Mill.) (Cav.), *Lavandula viridis* L'Hér, *Mentha pulegium* L., *Mentha spicata* L. e *Origanum vulgare* subsp. *virens* (Hoffmans & Link) Bonnier & Layens.

Neste sentido, procedeu-se à caracterização química dos óleos essenciais com vista a correlacionar o seu potencial antimicrobiano com os seus constituintes. Inicialmente foi efetuado um *screening* da atividade antimicrobiana recorrendo a ensaios em meio sólido. Posteriormente, pretendeu-se caracterizar o potencial antimicrobiano dos óleos essenciais através de ensaios em meio líquido. O efeito sinérgico entre os óleos essenciais foi também estudado, recorrendo a ensaios em meio líquido. A alteração da atividade que ocorre entre os óleos essenciais foi também avaliada por citometria de fluxo. A toxicidade dos óleos essenciais foi também estimada através de ensaios de letalidade em *Artemia salina* e estudos *in vivo* com a administração oral em ratinhos *Swiss*.

2.2. Objetivos específicos

Neste trabalho foram objetivos específicos:

- Proceder à extração dos óleos essenciais das plantas aromáticas medicinais em estudo através de hidrodestilação utilizando um equipamento tipo *Clevenger*, com determinação do rendimento de extração dos mesmos;
- Caracterizar os óleos essenciais fisicamente através da determinação do índice de refração e da densidade;
- Caracterizar os óleos essenciais quimicamente por cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama (GC-FID);

- Avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais face a estirpes bacterianas patogênicas gram-positivas e gram-negativas, utilizando os métodos de difusão em meio sólido e de microdiluição em meio líquido, com determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e da concentração mínima bactericida (CMB).
- Avaliar o efeito sinérgico entre os óleos essenciais face às estirpes bacterianas em estudo, utilizando métodos de microdiluição em meio líquido, com determinação da concentração mínima inibitória (CMI), da concentração mínima bactericida (CMB) e do índice de concentração inibitória fracionada (FIC);
- Caracterizar o efeito sinérgico entre os óleos essenciais através de ensaios de citometria de fluxo;
- Avaliar a letalidade dos óleos essenciais em *Artemia salina* com determinação do valor de CL₅₀;
- Avaliar a toxicidade dos óleos essenciais em ratinhos *Swiss* com determinação do valor de DL₅₀.

3. Introdução

3.1. Plantas aromáticas medicinais

As plantas aromáticas medicinais (PAMs) apresentam a capacidade de biossíntese de compostos bioativos com diversas aplicações medicinais (Huie, 2002). As PAMs são frequentemente encontradas na região Mediterrânea, onde são tradicionalmente utilizadas como condimentos e conservantes alimentares (Mata *et al.*, 2007). Estas encontram-se divididas por diversas famílias, nomeadamente, *Alliaceae*, *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Lamiaceae*, *Myrtaceae*, *Poaceae* e *Rutaceae* (Raut & Karuppayil, 2014).

A utilização destas plantas com fins medicinais é registada desde a antiguidade e o conhecimento da aplicabilidade de cada PAM foi transmitido às gerações seguintes (Petrovska, 2012). Posteriormente, diversos fitoquímicos isolaram e caracterizaram compostos bioativos das PAMs utilizados como fármacos (Balunas & Kinghorn, 2005).

3.2. Processos metabólicos nas plantas

Os compostos bioativos são definidos como metabolitos secundários, sintetizados em cada planta em resposta às necessidades da mesma (Azmir *et al.*, 2013). As PAMs são distinguidas das restantes plantas pelas suas propriedades farmacológicas, atribuídas à acumulação dos seus compostos bioativos com propriedades fisiológicas notórias (Lovkova *et al.*, 2001). Os compostos bioativos das PAMs, caracterizados pela sua estrutura complexa, são sintetizados como moléculas de comunicação e de defesa. A biossíntese destes compostos ocorre em estruturas secretoras da plantas, *e. g.*, nos tricomas glandulares, cavidades secretoras e ductos de resinas (Pavela & Benelli, 2016).

Os compostos bioativos são maioritariamente biossintetizados através de duas vias metabólicas, nomeadamente, via metabólica do ácido chiquímico e a via metabólica do ácido mevalónico (Pauli & Schilcher, 2010). Alguns autores consideram as vias metabólicas do ácido malónico e via metabólica do metileritritol fosfato (MEP)

igualmente importantes na biossíntese de compostos bioativos. Os compostos bioativos resultantes destas vias são divididos em três principais classes, designadamente, compostos terpênicos, alcaloides e compostos fenólicos (Azmir *et al.*, 2013). As vias metabólicas originárias das três principais classes de compostos encontram-se esquematizadas na Figura 1.

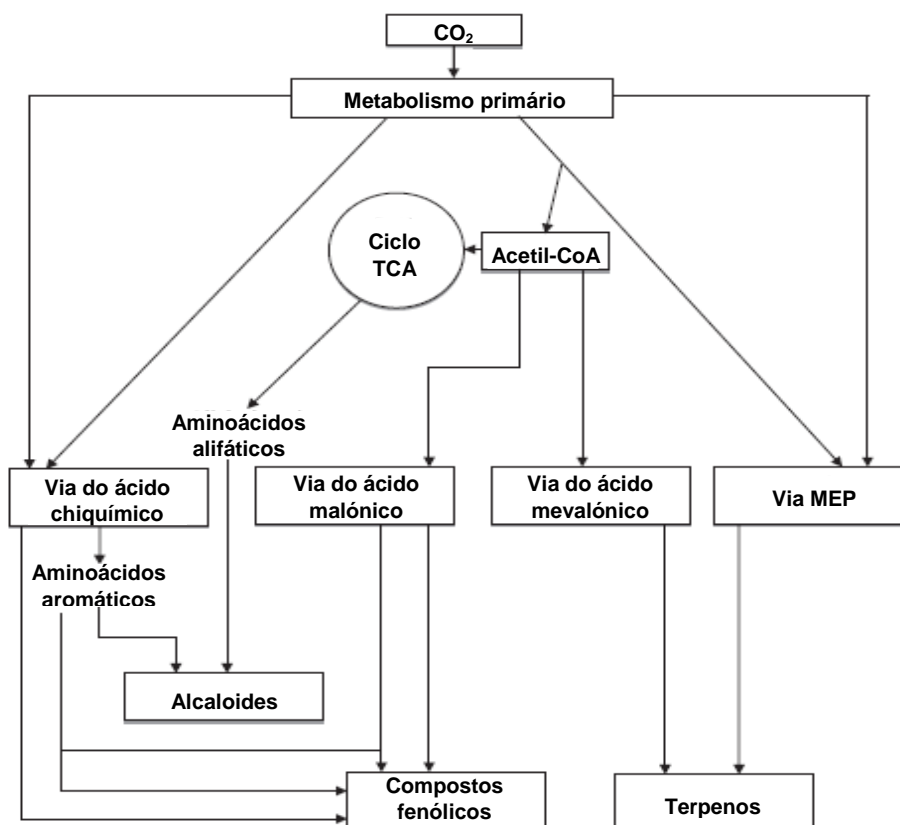


Figura 1 Esquema simplificado das vias metabólicas de biossíntese das três principais classes de compostos bioativos presentes nas plantas aromáticas medicinais (Adaptado de Azmir *et al.*, 2013).

A atividade antimicrobiana de vários óleos essenciais (OEs) é atribuída à presença de terpenos devido ao seu carácter lipofílico, juntamente com o carácter hidrofílico de alguns dos seus grupos funcionais (Koroch *et al.*, 2007). Os terpenos são compostos caracterizados pela sua constituição em diversas unidades isopreno (C_5), formados pela junção de unidades de pirofosfato de isopentenilo (IPP). Os terpenos são resultantes de duas vias metabólicas, nomeadamente, a via do ácido mevalónico e a via MEP. A via do ácido mevalónico é iniciada pela ligação de três moléculas de acetil-CoA, resultando na formação de ácido mevalónico. Posteriormente, o ácido mevalónico é pirofosforilado, descarboxilado e desidratado, resultando em difosfato de isopentenilo (IPP^2). O IPP é também biosintetizado pela via metabólica MEP, a qual é definida por

um ciclo fotossintético constituído por um conjunto de reações de redução de carbono (Chen *et al.*, 2011; Taiz & Zeiger, 2010).

O ácido chiquímico é sintetizado a partir de fosfoenolpiruvato e eritrose 4-fosfato, através da via metabólica da glicólise e da via metabólica das pentoses-fosfato. Este composto sintetiza aminoácidos aromáticos, os quais são precursores da formação de alcaloides (Taiz & Zeiger, 2010).

Os compostos fenólicos, resultantes da via metabólica do ácido chiquímico ou pela via metabólica do ácido malónico, são compostos com elevado potencial antimicrobiano (Zhu *et al.*, 2004). Nas plantas, a via metabólica do ácido chiquímico sintetiza a maioria dos compostos fenólicos. Este processo é iniciado pela remoção do grupo amina do aminoácido fenilalanina, originando ácido cinâmico. Posteriormente, ocorre a adição de vários constituintes, como os grupos hidroxilo, formando os compostos fenólicos (Taiz & Zeiger, 2010).

3.3. Óleos essenciais

Os óleos essenciais são originados no metabolismo secundário das plantas aromáticas, condimentares e medicinais (PAMs), constituídos por uma mistura complexa de diversos compostos de baixo peso molecular, caracterizados por dois a três componentes em concentrações relativamente elevadas (Bakkali *et al.*, 2008; Teixeira *et al.*, 2013). Os OEs são maioritariamente constituídos maioritariamente por terpenos, sendo, maioritariamente constituídos por monoterpenos hidrocarbonados e oxigenados, mas podendo ter também quantidades elevadas de sesquiterpenos hidrocarbonados e/ou oxigenados, consoante as espécies aromáticas e as condições edafo-climáticas (Saljoughian *et al.*, 2017).

A formação dos OEs é dependente do estado de diferenciação do tecido secretório, bem como da fase ontogenética da planta. Assim, ocorre uma variabilidade intraindividual, onde cada parte da PAM pode produzir um OE com constituição diferente (Pauli & Schilcher, 2010). Adicionalmente, observa-se a variabilidade intraespecífica na composição química do OE devido a fatores como localização geográfica ecótipo da PAM, nutrição, utilização de fertilizantes, clima, variação sazonal, *stress* e modo de tratamento do material vegetal após a colheita (Raut & Karuppayil, 2014). Assim, a

avaliação da variabilidade química de cada OE e de quais as suas propriedades biológicas é crucial na utilização dos OEs como fitofármacos ou nutracêuticos de modo sustentável (Hua *et al.*, 2011).

Atualmente é registado um interesse crescente pela utilização de OEs na indústria farmacêutica e alimentar, devido às suas propriedades biológicas reconhecidas, nomeadamente, propriedades antibacterianas, antissépticas, anti-mutagénicas, antioxidantes e anti-inflamatórias. As características de cada OE encontram-se associadas com a sua função na planta (Burt, 2004; Edris, 2007).

3.4. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais

Os OEs são reconhecidos pela sua atividade biológica e pela sua promissora aplicabilidade como antimicrobianos naturais, constituindo uma alternativa aos fármacos de síntese, frequentemente utilizados (Aggarwal *et al.*, 2002; Bakkali *et al.*, 2008). A família *Lamiaceae* é detentora de inúmeras PAMs com atividade antimicrobiana moderada a extrema (Boukhebti *et al.*, 2011; Bozin *et al.*, 2006). Adicionalmente, vários OEs são conhecidos pelo seu potencial antimicrobiano face a microrganismos resistentes a antimicrobianos de síntese, assim como, face a biofilmes (Raut & Karuppayil, 2014).

Devido ao elevado número de compostos químicos presentes em cada OE, a sua ação antimicrobiana é atribuída a diversos mecanismos de ação que atuam em simultâneo (Talbaoui *et al.*, 2012). Consequentemente, a mistura irregular de compostos químicos presente no OE não atua em alvos específicos da célula, prevenindo os mecanismos microbianos de adaptação e/ou resistência ao OE (Soković *et al.*, 2013; Zuzarte *et al.*, 2012).

O modo de ação dos OEs ainda não se encontra completamente conhecido devido aos diferentes fenómenos que estes causam nas células microbianas (Talbaoui, *et al.*, 2012). Na figura 2 encontra-se esquematizado o conjunto de mecanismos antibacterianos mais comuns observados quando a bactéria é exposta a OEs. Vários autores descrevem como principal mecanismo de ação dos OEs a destabilização da membrana celular (Dagli *et al.*, 2015; Raut & Karuppayil, 2014; Talbaoui *et al.*, 2012). O carácter lipofílico dos OEs é um fator importante na sua ação antimicrobiana, uma vez

que lhes permite atravessar a membrana, podendo interagir com o conteúdo intracelular (Gutierrez *et al.*, 2009). O modo de ação específico é dependente da constituição química dos OEs, bem como dos grupos funcionais das substâncias que os constituem (Dagli *et al.*, 2015). De modo geral, os mecanismos de ação dos OEs incluem a deterioração da membrana, aumento da permeabilidade membranar, coagulação do conteúdo citoplasmático, alterações ao nível da bomba protónica, redução do potencial de membrana e perda do conteúdo intracelular. Parte dos mecanismos de ação dos OEs podem ocorrer em consequência de outro mecanismo anterior, *e.g.*, alterações intracelulares após mecanismos de deterioração da membrana (Burt, 2004; Nazzaro *et al.*, 2013). Adicionalmente, alguns OEs apresentaram também a capacidade de destabilizar o sistema designado frequentemente por “*quorum sensing*” bacteriano, o qual está associado à redução da produção de estímulos bacterianos e, conseqüentemente, reduz a capacidade de o microrganismo se adaptar ao ambiente a que se encontra exposto (Nazzaro *et al.*, 2013; Adonizio *et al.*, 2006).

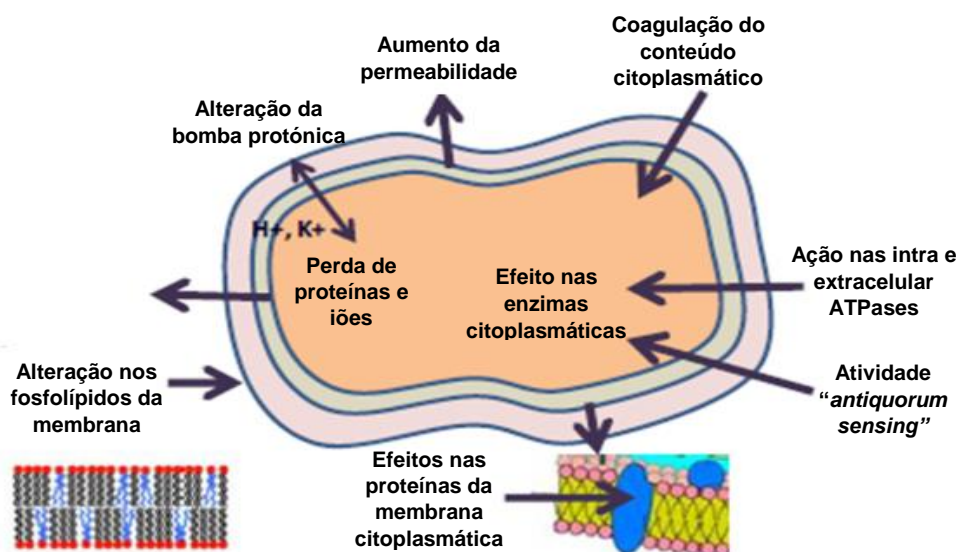


Figura 2 Esquematização dos mecanismos de ação dos óleos essenciais na célula bacteriana (Adaptado de Nazzaro *et al.*, 2013).

3.5. Sinergismo entre os óleos essenciais

Diversos estudos relatam a singularidade dos OEs devido à sua constituição complexa caracterizada por variadas classes de compostos químicos, os quais

estabelecem interações entre si, resultando em atividades biológicas mais eficazes do que os componentes majoritários dos OEs quando aplicados isolados (Candy *et al.*, 2017; Lv *et al.*, 2011). O princípio do efeito sinérgico assenta na interação entre dois ou mais componentes causar um efeito biológico superior ao somatório dos efeitos biológicos de cada componente em isolado, sendo este último designado de efeito aditivo (Harris, 2002). Quando se encontram em mistura, os OEs podem potenciar as suas propriedades, assim como adquirir novas características resultantes do sinérgico entre os mesmos (Bassolé & Juliani, 2012). Assim, ao misturar dois OEs que estabeleçam efeito sinérgico entre si é possível diminuir a concentração total de OE a aplicar para atingir uma dose eficaz (Espina *et al.*, 2013; Gutierrez *et al.*, 2009).

Assim, numa mistura de OEs podem observar-se três tipos de interação, tais como, efeito aditivo, efeito sinérgico e efeito antagónico. Estes efeitos são igualmente observados entre os componentes de um OE quando utilizado isolado (Bassolé & Juliani, 2012). Ao nível do potencial antimicrobiano, podem ainda distinguir-se três mecanismos de interação sinérgica, nomeadamente, a ação simultânea em diversas vias metabólicas e/ou centros ativos, alterações farmacocinéticas ou físico-químicas e inibição de mecanismos de resistência a compostos antibacterianos. O efeito antagónico dos OEs pode ser observado quando os componentes reduzem acentuadamente o seu potencial antimicrobiano (Owen & Laird, 2018). Estudos sobre as interações estabelecidas nos OEs indicam a ocorrência de um efeito aditivo entre OEs, quando os compostos apresentam uma estrutura química idêntica, o sinérgico ocorre maioritariamente entre compostos fenólicos e o efeito antagónico é resultante da interação entre monoterpenos oxigenados e não oxigenados (Bassolé & Juliani, 2012).

Segundo Rhind (2015), o efeito sinérgico pode ainda ser classificado segundo a constituição da mistura e a sua finalidade, designadamente, sinérgico horizontal e sinérgico vertical. No sinérgico horizontal, a mistura é constituída por compostos com grupos funcionais semelhantes com a finalidade de acentuar um efeito específico. Por outro lado, no efeito sinérgico vertical, a mistura é constituída por diferentes grupos funcionais, com vista a obter diversos efeitos biológicos. Esta ideologia é especialmente útil para formulação de misturas a utilizar em aromaterapia.

Geralmente, a avaliação do efeito sinérgico entre OEs é realizada através de três metodologias: ensaios *checkerboard*, métodos gráficos e procedimentos *time-kill*. No método *checkerboard*, o efeito sinérgico é avaliado segundo a determinação do índice de concentração inibitória fracionada (FIC). Este procedimento foi primeiramente concebido para a avaliação do efeito sinérgico entre fármacos e posteriormente têm

surgido adaptações para a sua utilização em óleos essenciais. Conseqüentemente, os valores de FIC tomados como referência têm igualmente sofrido adaptações, sendo este facto um obstáculo na comparação de resultados entre autores (Bassolé & Juliani, 2012; Hyldgaard *et al.*, 2012). Adicionalmente, alguns autores dividem o efeito sinérgico em duas classes, nomeadamente, efeito sinérgico total e efeito sinérgico parcial (Gallucci *et al.*, 2009; Mun *et al.*, 2013; Timurkaynak *et al.*, 2006). Na tabela 1 são apresentadas oito classificações frequentemente utilizadas em estudos de efeito sinérgico de OEs e/ou compostos químicos isolados de OEs.

Tabela 1 Interpretação do índice FIC segundo diferentes estudos realizados sobre o efeito sinérgico entre óleos essenciais e/ou compostos isolados de óleos essenciais.

FIC					
	Efeito sinérgico	Efeito aditivo	Indiferente	Antagonismo	Referências
Classificação 1	$\leq 0,5$	0,5 – 1	$\geq 1 - 4$	> 4	Grbić <i>et al.</i> , 2018; Nikkhah <i>et al.</i> , 2017; Bassolé <i>et al.</i> , 2011;
Classificação 2	$\leq 0,5$	0,5 – ≤ 1	-	> 1	Adrar <i>et al.</i> , 2016; Knezevic <i>et al.</i> , 2016; Rosato <i>et al.</i> , 2007;
Classificação 3	$\leq 0,5$	0,5 – 4	-	≥ 4	Zengin & Baysal, 2014; Zore <i>et al.</i> , 2011; De Azeredo <i>et al.</i> , 2011;
Classificação 4	$\leq 0,5$	-	0,5 – 4	≥ 4	Owen & Laird, 2018; Vieira <i>et al.</i> , 2017; Magi <i>et al.</i> , 2015;
Classificação 5	$\leq 0,75$	0,75 – 1	$\geq 1 - 4$	≥ 4	Mun <i>et al.</i> , 2013;
Classificação 6	$\leq 0,75$	0,75 – 2	-	≥ 2	Gallucci <i>et al.</i> , 2009; Fadli <i>et al.</i> , 2012; Wang <i>et al.</i> , 2018;
Classificação 7	$\leq 0,9$	0,9 – 1,1	-	$\geq 1,1$	Romano <i>et al.</i> , 2009; Santiesteban-López <i>et al.</i> , 2006;
Classificação 8	< 1	~ 1	-	> 1	Singh <i>et al.</i> , 2000;
Classificação 9	< 1	1	$\geq 1 - 2$	≥ 2	Pei <i>et al.</i> , 2009;

Apesar das diversas opiniões sobre o efeito sinérgico, este é escolhido entre os autores de modo a descrever três princípios, designadamente, o decréscimo na população microbiana é superior a 90%, a existência de uma diferença significativa entre o potencial antimicrobiano dos componentes em isolado e os componentes em mistura e em mistura é observado um decréscimo de 2-log UFC. O efeito sinérgico pode também ser confirmado através da curva descrita pela representação gráfica dos

valores de concentração mínima inibitória (CMI) de cada um dos componentes, o isoblograma (Bassolé & Juliani, 2012).

3.6. Estirpes bacterianas patogênicas resistentes

O crescente número de estirpes bacterianas resistentes a agentes antimicrobianos limita a terapêutica disponível para estas estirpes. Conseqüentemente, as patologias provenientes destes microrganismos podem também requerer a utilização de maior concentração de fármaco, podendo originar efeitos tóxicos (Penchovsky & Traykovska, 2015). Ao nível hospitalar, as patologias causadas por microrganismos resistentes resultam no aumento das taxas de morbidade e mortalidade, assim como no aumento do tempo de internamento e dos custos associados ao mesmo (Cosgrove & Carmeli, 2003).

Os antimicrobianos produzidos por síntese desempenham um papel importante no tratamento e prevenção de patologias infectocontagiosas. Contudo, a sua utilização exagerada levou ao aumento do aparecimento de estirpes bacterianas resistentes aos mesmos (Yap *et al.*, 2013). Em 2016, a situação de esgotamento de antimicrobianos eficazes face a estirpes bacterianas resistentes levou a WHO a criar uma lista de microrganismos patogênicos para os quais é prioritária a descoberta de novos fármacos antimicrobianos. Na lista mencionada encontram-se diversas estirpes com resistência a diversos antimicrobianos de síntese, tais como, *Escherichia coli*, *Morganella* sp., *Proteus* sp., *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* (Tacconelli *et al.*, 2017).

Atualmente, tem-se observado um crescente interesse pela utilização de fármacos de origem natural face a estirpes bacterianas resistentes. Os OEs são conhecidos pela sua ação eficaz face a este tipo de estirpes bacterianas, sem despoletar mecanismos de resistência. Neste sentido, os OEs apresentam uma solução promissora no combate de estirpes resistentes aos antimicrobianos comerciais. Adicionalmente, têm sido realizados diversos estudos que reportam a ocorrência de efeito sinérgico entre os OEs e antimicrobianos de síntese, diminuindo a dose terapêutica e a adaptação dos microrganismos à mistura (Ambrosio *et al.*, 2017; Sakkas *et al.*, 2016; Yap *et al.*, 2013).

Para o presente estudo selecionaram-se as estirpes bacterianas patogênicas e/ou oportunistas associadas a infecções hospitalares, nomeadamente, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Morganella morganii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella enteritidis* e *Salmonella typhimurium*.

Enterococcus faecalis é uma espécie anaeróbia aerotolerante gram-positiva. Este microrganismo é frequentemente encontrado no trato gastrointestinal de mamíferos. As colônias de *E. faecalis*, em meio de agar nutritivo (NA), são esféricas lisas de cor branca. A patogenicidade desta estirpe é frequentemente associada à formação de biofilmes (Zhou & Li, 2015; Brinkman & Patel, 2015).

Staphylococcus aureus é uma espécie bacteriana gram-positiva anaeróbia facultativa, frequentemente diagnosticada na rotina clínica. Em NA, as colônias têm aparência dourada e brilhante. A sua patogenicidade está associada maioritariamente às toxinas produzidas. São reconhecidas diversas mutações genéticas associadas a mecanismos de resistência desta bactéria, entre estas, a estirpe de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) (Bagnoli *et al.*, 2018).

Staphylococcus epidermidis é a espécie coagulase-negativa mais frequentemente encontrada nas superfícies epiteliais de humanos. Estes microrganismos são anaeróbios facultativos, gram-positivos, e formam tipicamente colônias brancas com cerca de 1-2 mm de diâmetro. A *S. epidermidis* é um microrganismo nasocomial patogênico reconhecida pela sua capacidade de sobrevivência distinta, caracterizada pela formação de biofilmes que inibem a maioria dos mecanismos de defesa do organismo hospedeiro (Fey, 2013).

Escherichia coli é uma espécie anaeróbia facultativa, gram-negativa, frequentemente encontrada no lúmen intestinal dos animais de sangue quente e répteis, motivo pelo qual é considerado um indicador de contaminação fecal. A maioria das estirpes de *E. coli* são inoquas, contudo, algumas estirpes são produtoras de toxinas associadas a diversas patologias. A *E. coli* é caracterizada pela elevada diversidade genética e fenotípica moldada pelo hospedeiro e pelo ambiente (Tenailon *et al.*, 2010).

Morganella morganii é uma espécie bacilar, anaeróbio facultativo, gram-negativo, pertencente à flora normal intestinal do homem. Contudo, esta é frequentemente isolada em isolados clínicos de infecções nasocomiais. Na clínica é comum a identificação de estirpes com resistência a diversos antimicrobianos. Esta

estirpe é semelhante ao género *Proteus*, motivo pelo qual foi anteriormente classificada *Proteus morganii* (Chang *et al.*, 2011; Engelkirk & Duben-Engelkirk, 2008).

Pseudomonas aeruginosa é uma espécie aeróbia, gram-negativa, com capacidade de adaptação a ambientes extremos devido à elevada percentagem de reguladores transcripcionais. A sua patogenicidade deve-se a esta bactéria utilizar como factor de virulência a exotoxina A que se liga ao factor de alongamento 2 dos microorganismos eucariotas, provocando um défice de produção de proteínas. A *P. aeruginosa* pode causar patologias infecciosas agudas ou crónicas (Franklin *et al.*, 2011; Frank, 2012).

Proteus mirabilis é uma espécie gram-negativa, anaeróbia facultativa, primariamente associada a infeções do trato urinário. Esta estirpe é caracterizada pela elevada mobilidade, assim como pela capacidade de aderência a superfícies. Na transição entre meios sólidos e meios líquidos, as células adaptam a sua estrutura flagelada através de processos de diferenciação das suas células vegetativas (Rather, 2005).

Pertencente a dois dos serotipos de *Salmonella enterica*, a espécie *Salmonella enteritidis* e a espécie *Salmonella typhimurium* são bacilos gram-negativos e anaeróbios negativos. Estes microrganismos são caracterizados pelos antígenos O, H e Vi. A maioria dos serotipos de *Salmonella enterica* possuem flagelos, os quais lhes conferem mobilidade. Estes microrganismos são frequentemente associados a infeções gastrointestinais simples e a febre entérica (Gianella, 1996).

Com vista a comparar os resultados obtidos foi utilizado o antimicrobiano sintético de largo espectro tetraciclina (TE), em solução aquosa. A tetraciclina atua ao nível da inibição da síntese proteica ao impedir a ligação do aminoacil-t-RNA ao aceitador ribossomal. A ausência de efeitos coleterais associados à tetraciclina resultou na sua extensa utilização na terapêutica de infeções em humanos e animais, bem como em doses subterapêuticas, em animais, de modo a prevenir potenciais patologias. Consequentemente, o aparecimento de estirpes resistentes à TE foi notório. Contudo, devido à sua eficácia face a um elevado número de microrganismos, este antimicrobiano ainda apresenta elevada importância ao nível clínico (Chopra & Roberts, 2001).

3.7. Avaliação da viabilidade celular

Em microbiologia, os métodos de classificação da viabilidade celular clássicos assentam no paradigma: se a célula é viável tem a capacidade de se multiplicar de modo a formar colónias visíveis em meio sólido (Keer & Birch, 2003). Contudo, as populações bacterianas podem encontrar-se metabolicamente ativas, porém não são providas da capacidade de se multiplicarem em meio sólido. Este estado bacteriano é reversível e, quando as células são submetidas a condições apropriadas, podem ser reativadas e novamente cultiváveis (Oliver, 2005; Khan *et al.*, 2010). Adicionalmente, é estimado que apenas cerca de 1% das estirpes bacterianas obtidas em amostras ambientais sejam cultiváveis (Davey, 2011).

Face ao exposto, a determinação da viabilidade celular pelo método da determinação da concentração mínima bactericida (CMB) pode originar resultados “falsos negativos”. Segundo Oliver (2005), a determinação do número total de células pode ser realizada recorrendo à avaliação de parâmetros como a hidrólise intracelular, a atividade metabólica das desidrogenases ou a integridade da membrana celular. Assim, no presente estudo, a viabilidade celular foi confirmada por ensaios de avaliação da atividade das enzimas desidrogenases. Adicionalmente, a veracidade dos resultados foi avaliada através da determinação da integridade da membrana, recorrendo a ensaios de citometria de fluxo.

Os ensaios em citometria de fluxo permitem distinguir células viáveis, em início de apoptose, em apoptose e mortas. Durante a apoptose inúmeros eventos morfológicos e bioquímicos ocorrem na célula, nomeadamente, retração celular, danificação da membrana celular, condensação nuclear, fragmentação do DNA, fragmentação mitocondrial, ativação de caspases apoptóticas e externalização de fosfatidilserina (PS) na membrana plasmática (Engeland *et al.*, 1998; Henry *et al.*, 2013). A anexina V, uma proteína fosfolipídica, utilizada em ensaios de citometria, apresenta afinidade com a PS. A sensibilidade deste método pode ser aumentada utilizando fluorocromos, como o iodeto de propídeo (PI) (Hingorani *et al.*, 2011).

3.8. Plantas aromáticas medicinais em estudo

A família *Lamiaceae* é reconhecida por ser uma fonte de óleos essenciais com diversas propriedades biológicas. Estes apresentam impacto económico na indústria da cosmética e dos fitoterapêuticos alternativos (Bakkali *et al.*, 2008; González-Coloma *et al.*, 2011). Neste trabalho, foram selecionadas sete plantas aromáticas desta família, nomeadamente, *Calamintha nepeta* (L.) Savi, *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri* (Rozeira), *Lavandula pedunculata* (Mill.) (Cav.), *Lavandula viridis* L'Hér, *Mentha pulegium* L., *Mentha spicata* L. e *Origanum vulgare* subsp. *virens* (Hoffmans & Link) Bonnier & Layens. A classificação taxonómica das plantas aromáticas em estudo encontra-se na tabela 2.

Tabela 2 Descrição taxonómica das plantas aromáticas em estudo: *Calamintha nepeta* (L.) Savi, *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri* (Rozeira), *Lavandula pedunculata* (Mill.) (Cav.), *Lavandula viridis* L'Hér, *Mentha pulegium* L., *Mentha spicata* L. e *Origanum vulgare* subsp. *virens* (Hoffmans & Link) Bonnier & Layens (FloraOn, 2018; Flora ibérica 2018).

Nome vulgar	Erva-das-azeitonas	Rosmaninho	Rosmaninho-maior	Rosmaninho-verde	Poejo	Hortelã	Oregão
Reino	Plantae						
Divisão	Spermatophyta						
Subdivisão	Magnoliophytina						
Ordem	Lamiales						
Família	Lamiaceae						
Género	<i>Calamintha</i>	<i>Lavandula</i>	<i>Lavandula</i>	<i>Lavandula</i>	<i>Mentha</i>	<i>Mentha</i>	<i>Origanum</i>
Espécie	<i>C. nepeta</i>	<i>L. stoechas</i>	<i>L. pedunculata</i>	<i>L. viridis</i>	<i>M. pulegium</i>	<i>M. spicata</i>	<i>O. vulgare</i>
Sub-espécie		<i>luisieri</i>					<i>virens</i>

A *Calamintha nepeta* (L.) Savi (Figura 3), vulgarmente conhecida como erva-das-azeitonas, é uma planta aromática espontânea amplamente distribuída pela área mediterrânica (FloraOn, 2018; Baldovini *et al.*, 2000). Esta planta perene tem uma aparência semelhante à hortelã comum, sendo distinguida pela sua fragrância e pelas suas flores brancas ou lilás (Božovic *et al.*, 2017). É frequentemente encontrada em sítios secos, taludes, sebes, sotos, pinhais, prados sombrios e lugares nitrificados (FloraOn, 2018). Tradicionalmente, é utilizada como condimento alimentar e valorizada pelo seu elevado potencial farmacológico no tratamento de patologias respiratórias e gastrointestinais (Flamini *et al.*, 1999).



Figura 3 *Calamintha nepeta* (L.) Savi, Herdade da Mitra, Évora.

A *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri* (Rozeira) (*L. luisieri*) é caracterizada pelo seu crescimento em arbusto pequeno, com suas inflorescências do tipo espiga, de coloração violeta, em forma cilíndrica (Figura 4). Esta PAM é endêmica da Península Ibérica, sendo frequentemente encontrada em áreas semiáridas do Sul de Portugal e Sudoeste de Espanha (González-Coloma *et al.*, 2011; Matos *et al.*, 2009). Embora as PAMs de género *Lavandula* sejam amplamente utilizadas na indústria e esta espécie seja conhecida pela produção de OEs com composição química complexa, poucos estudos têm sido realizados sobre *L. luisieri* (Sanz *et al.*, 2004).



Figura 4 *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri* (Rozeira), Herdade da Mitra, Évora.

A *Lavandula pedunculata* subsp. *pedunculata* (Mill.) (Cav.) (Figura 5) é um arbusto perene caracterizado pela sua folhagem verde acinzentada em forma de espiga podendo crescer até 70 cm. As suas flores lilases podem atingir 24 cm são cobertas por diversos tipos de tricomas glandulares (Baptista *et al.*, 2015). Esta PAM, frequentemente encontrada na Península Ibérica, é endêmica da zona noroeste de Portugal e frequentemente utilizada na medicina tradicional (Costa *et al.*, 2013).



Figura 5 *Lavandula pedunculata* subsp. *pedunculata* (Mill.) (Cav.) (FloraOn, 2018).

A *Lavandula viridis* L'Hér (Figura 6) é um arbusto endêmico do Sudoeste da Península Ibérica, com folhagem abundantemente e cor totalmente verde, desenvolvendo algumas flores brancas em época de floração. Devido à sua aparência, é vulgarmente denominada rosmaninho branco ou verde. Esta PAM tem a capacidade de crescer em ambiente seco e solos pobres em nutrientes. A *L. viridis* é economicamente importante na indústria dos cosméticos e perfumaria. Ao nível tradicional, é utilizada como biocida e tranquilizante (Dias *et al.*, 2002; Zuzarte *et al.*, 2011).



Figura 6 *Lavandula viridis* L'Hér (Flora On, 2018).

Mentha pulegium L. (Figura 7), conhecida vulgarmente como poejo e hortelã-pimenta-mansa, é uma espécie endêmica da região Mediterrânea, muito frequente em ambientes húmidos e leitos secos de linhas de água (FloraOn, 2018). Esta PAM apresenta um potencial benéfico devido ao seu efeito antimicrobiano, anti-inflamatório e antioxidante (Brahmi *et al.*, 2017; Raut & Karuppaiyl, 2014). Na medicina tradicional é utilizada como analgésico, antitússico, antipirético e antisséptico. Existem também relatos da sua aplicabilidade como repelente (Mahboubi & Kazempour, 2009).



Figura 7 *Mentha pulegium* L. (FloraOn, 2018).

A *Mentha spicata* L. (Figura 8) é uma das plantas de género *Mentha* com maior reconhecimento ao nível económico. Esta PAM é originária na Europa, África e Ásia e atualmente é cultivada pelo mundo inteiro (Shahbazi, 2015). Na medicina tradicional, esta PAM é utilizada em fitoterapia no tratamento de bronquites, sinusites, enjoos e como antidoto a alguns tipos de venenos (Brahmi *et al.*, 2017). Os OEs de *M. spicata* têm sido estudados no âmbito do seu potencial antimicrobiano, sendo comprovada a eliminação eficaz de uma estirpe de *Staphylococcus aureus* MRSA (Boukhebt *et al.*, 2011).



Figura 8 *Mentha spicata* L. (Jardim Botânico UTAD, 2018).

O género *Origanum* é caracterizado por uma elevada diversidade morfológica e fitoquímica. Apesar da espécie *O. vulgare* ser reconhecida mundialmente, algumas subespécies apenas se encontram em climas temperados e zonas áridas da Europa e Ásia (Pauli & Schilcher, 2010). As diferentes subespécies de *O. vulgare* são distinguidas pelas diferenças no indumento e cor e tamanho das brácteas e flores (Lukas *et al.*, 2015). As plantas de *Origanum vulgare* subsp. *virens* (Hoffmans & Link) Bonnier & Layens (Figura 9) apresentam flores brancas e são espontâneas em matos, prados,

taludes e orlas de bosques e matagais no Alentejo e em outras regiões Mediterrâneas (FloraOn 2018). Na medicina tradicional portuguesa, esta PAM é utilizada no tratamento de infeções respiratórias e cutâneas, bem como antiespasmódico (Vale-Silva *et al.*, 2012).



Figura 9 *Origanum vulgare* subsp. *virens* (Hoffmans & Link) Bonnier & Layens, Herdade da Mitra, Évora.

4. Materiais e métodos

4.1. Seleção e preparação das plantas

Para o presente estudo foram selecionadas sete espécies autóctones de plantas aromáticas e condimentares da região Alentejo, nomeadamente, *Calamintha nepeta* (L.) Savi, *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri* (Rozeira), *Lavandula pedunculata* subsp. *pedunculata* (Mill.) (Cav.), *Lavandula viridis* L'Hér, *Mentha pulegium* L., *Mentha spicata* L. e *Origanum vulgare* subsp. *virens* (Hoffmans & Link) Bonnier & Layens. Procedeu-se à colheita da parte aérea das plantas elegidas nos locais e datas registados na tabela 3. Apenas as PAMs *L. luisieri*, *L. pedunculata* e *L. viridis* se encontraram no estado florido. A identificação das plantas foi realizada pela Prof^a Marízia Pereira, da Universidade de Évora e procedeu-se ao depósito de um exemplar de cada espécie no Herbário de Plantas Aromáticas da Universidade de Évora.

O material vegetal foi mantido em local escuro e isento de humidade, triturado e alíquotado, sendo, posteriormente, conservado a -20 °C, até à extração dos OEs.

Tabela 3 Local e época de colheita das plantas aromáticas medicinais em estudo.

Planta	Local de colheita	Coordenadas	Data de colheita
<i>C. nepeta</i>	Herdade da Mitra	38°31'52.8"N 8°00'47.6"W	maio 2016
<i>L. luisieri</i>	Herdade da Mitra	38°31'52.8"N 8°00'47.6"W	abril 2017
<i>L. pedunculata</i>	Guadalupe	38° 34' 6" N, 8° 1' 33" W	maio 2014
<i>L. viridis</i>	Aljustrel	37°52'36"N 8°09'58"W	abril 2017
<i>M. pulegium</i>	Montoito	38°30' 18.7" N; 7°34' 23.3" W	maio 2016
<i>M. spicata</i>	Montoito	38°30' 18.7" N; 7°34' 23.3" W	maio 2016
<i>O. vulgare</i>	Herdade da mitra	38°31'52.8"N 8°00'47.6"W	abril 2017

4.2. Reagentes

Nos ensaios de avaliação da atividade antimicrobiana preparam-se meios de cultura de *Nutrient Agar* (NA) adquirido a Himedia, *Mueller Hinton Agar* (MHA) adquirido a Merck e *Mueller Hinton Broth* (MHB) adquirido a Oxoid. Nos métodos de microdiluição

foi utilizado dimetilsulfóxido (DMSO), polisorbato (*Tween*) e *p*-iodonitrotetrazolium (INT). Todos os reagentes utilizados são pró-análise e foram adquiridos a Sigma-Aldrich. Nos ensaios em citometria de fluxo foi utilizado iodeto de propídio (PI) e *Anexin V & Dead Cell kit* adquiridos a Merck.

4.3. Extração dos óleos essenciais

Os óleos essenciais foram obtidos por hidrodestilação recorrendo a um sistema tipo *Clevenger*, durante 3 horas, de acordo com as recomendações da Farmacopeia Portuguesa, 2008 (Comissão da Farmacopeia Portuguesa, 2008). Genericamente, a cerca de 100 g de material vegetal foram adicionados cerca de 800 mL de água destilada e colocados num balão de destilação, em manta de aquecimento e adaptado o sistema de *Clevenger*. O processo de extração foi caracterizado com determinação do rendimento de extração, da massa volúmica e do índice de refração dos OEs. Estes foram armazenados a -20 °C.

4.4. Determinação do índice de refração

O índice de refração dos OEs foi determinado recorrendo a um refratómetro (Leica ABBE Mark II). As análises dos OEs foram realizadas em conformidade com as instruções do equipamento, após à calibração do mesmo com água bidestilada. O valor do índice de refração foi calculado de acordo com a fórmula: $n_{d_{20}} = n_{dt} + 0.00045 (t - 20)$, onde $n_{d_{20}}$ corresponde ao índice de refração a 20 °C; n_{dt} é o índice de refração medido à temperatura do laboratório e t a temperatura no momento da medição.

4.5. Análise da composição química dos óleos essenciais por cromatografia gasosa (GC)

A análise da composição química dos OEs foi realizada por cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama (GC-FID), num cromatógrafo GC-HP 5890 Series II. A fase estacionária utilizada foi uma coluna polar SUPELCOWAX TM 10 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) e a fase móvel foi constituída por hélio como gás de arraste, com um fluxo de 0,6 mL/min e razão de *split* de 50:1. Para separação dos óleos essenciais programou-se um gradiente de temperatura de 70 °C (3 min), 70 °C - 220 °C (3 °C/min) e 220°C (5 min) e ajustou-se a temperatura do injetor e do detetor para 250 °C. O volume injetado foi de 0,2 µL de OE puro. As análises de cada uma das amostras foram efetuadas em triplicado. A quantificação dos componentes dos óleos essenciais foi determinada pelo método de normalização interna com base na área dos picos sem correção de fator de resposta. A identificação dos componentes foi efetuada por comparação dos respetivos índices de retenção (IR), calculados em relação a uma série homóloga de *n*-alcanos de C8-C20, (Sigma Aldrich) com os de padrões puros ou mencionados na literatura e confirmados pelo método da adição padrão (Cavaleiro *et al.*, 2004; Mottram, 2007).

4.6. Avaliação da atividade antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana dos OEs foi realizada face a várias estirpes bacterianas patogénicas e/ou oportunistas Gram-positivas (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* LFG 1007, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228) e Gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* LFG 1003, *Morganella morganii* LFG 1008, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas aeruginosa* LFG 1002, *Proteus mirabilis* LFG 1004, *Salmonella enteritidis* LFG 1005 e *Salmonella typhimurium* LFG 1006).

Para o efeito, foram selecionados estudos de difusão em meio sólido e de microdiluição em meio líquido para determinação da concentração mínima inibitória (CMI), concentração mínima bactericida (CMB) e determinação do índice de concentração inibitória fracionada (FIC).

Os ensaios foram realizados segundo as normas CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) (NCCS, 2007) e toda a manipulação dos

microrganismos foi efetuada numa Câmara de Fluxo de Ar Laminar (Airstream® Class II Biological safety Cabinet (AC2-4E1)).

4.6.1. Preparação das suspensões microbianas

Os microrganismos selecionados para o estudo da atividade antimicrobiana foram primeiramente repicados e incubados nas condições ótimas de crescimento a 37 °C em meio de *nutriente agar* (NA), durante 24 horas.

Posteriormente, prepararam-se as suspensões microbianas em soro fisiológico (0,9 %), na concentração 10⁸ UFC/mL, utilizando como referência a turbidez 0,5 na escala de *McFarland* (Barry *et al.*, 1999).

4.6.2. Ensaio de difusão em meio sólido

Os ensaios de difusão em meio sólido permitem estimar a atividade antimicrobiana dos OEs através da dimensão do halo de inibição obtido no antibiograma (Lang & Buchbauer, 2012). A avaliação da sensibilidade dos microrganismos aos OEs em meio sólido foi efetuada em meio MHA, as placas foram inoculadas, com as suspensões bacterianas 0,5 *McFarland*, por espalhamento, para cada um dos microrganismos de acordo com as Normas M02-A12 (NCCS, 2007). Em cada placa e, para cada OE, colocaram-se três discos equidistantes de papel *Whatman* estéril (Ø=6mm), aos quais se adicionou o volume de 5 µL de OE (Martins *et al.*, 2014). De modo a evitar a volatilização do OE, as placas foram pré-incubadas durante uma hora a 4 °C. Seguidamente, as placas foram incubadas a 37 °C durante 24 horas (NCCLS, 2007). Como controlo, utilizaram-se discos impregnados com 5 µL de antimicrobiano padrão, cloridrato de tetraciclina (TE-Cl) em solução aquosa (30 µg/mL).

A sensibilidade dos microrganismos aos OEs foi classificada como não sensíveis com halos de inibição inferiores a 6 mm, moderadamente sensíveis com halos de inibição entre 6 e 8 mm, sensíveis com halos de inibição entre 9 e 14 mm, muito sensíveis com halos de inibição entre 15 e 19 mm e extremamente sensíveis para halos de inibição superiores a 20 mm (Moreira *et al.* 2005; Ponce *et al.* 2003).

A atividade dos OEs foi classificada como não ativo com halos de inibição inferiores a 6 mm, moderadamente ativos com halos de inibição entre 6 e 8 mm e extremamente ativos com halos de inibição superiores a 9 mm.

4.6.3. Ensaios em meio líquido

Os ensaios em meio líquido foram realizados para avaliação da concentração mínima inibitória do crescimento bacteriano (CMI). Quando observado no equipamento estereoscópico, este valor é definido como a concentração mínima de OE que inibe o crescimento microbiano visível, (Delaquis *et al.*, 2002). Este resultado é confirmado por turbidimetria, correspondendo, à concentração de OE necessária para inibir 90 % do crescimento microbiano, a 630 nm (Moreira *et al.*, 2005).

Os estudos de avaliação da sensibilidade aos óleos essenciais em meio líquido foram efetuados em microplaca, utilizando meio MHB, com determinação da concentração mínima inibitória (CMI), concentração mínima bactericida (CMB) e avaliação da viabilidade celular com ensaio de INT.

Nos estudos em meio líquido foram testadas concentrações de OE entre 0,25 e 5,0 µL/mL. Para o efeito, preparou-se uma solução inicial de OE de 100 µL/mL em DMSO, a partir da qual se efetuaram as restantes soluções de OE, nas concentrações a testar, em meio de cultura suplementado com *Tween* 80 a 5% e DMSO a 10%.

As suspensões dos microrganismos foram preparadas na concentração de 10^8 UFC/mL, e posteriormente diluídas na proporção 1:100, em meio de cultura, para ser obtida a concentração de 10^6 UFC/mL, a utilizar nos ensaios em meio líquido. Prepararam-se controlos negativos contendo solução de meio de cultura suplementado com *Tween* 80 a 5% e DMSO 10% e meio de cultura em volumes iguais e controlos positivos contendo suspensão de microrganismos e a mesma solução de meio de cultura. Como padrão foi utilizada solução aquosa de cloridrato de tetraciclina nas concentrações entre 2 000 e 0,975 µg/mL.

Os ensaios foram realizados em microplaca, em triplicado. A cada poço adicionaram-se 75 µL de solução de OE/padrão e 75 µL de suspensão de microrganismos (10^6 UFC/mL). As microplacas foram incubadas a 37 °C, durante 16 h. O crescimento microbiano foi avaliado recorrendo a um sistema estereoscópico

(Olympus SZX9) e confirmado por leitura da turbidimetria a 630 nm, para avaliação da CMI (NCCS, 2015).

Os ensaios foram realizados em microplaca, em triplicado. A cada poço adicionaram-se 75 μ L de solução de OE/padrão e 75 μ L de suspensão de microrganismos (10^6 UFC/mL). As microplacas foram incubadas a 37 °C, durante 16 h. O crescimento microbiano foi avaliado recorrendo a um sistema estereoscópico (Olympus SZX9) e confirmado por leitura da turbidimetria a 630 nm, para avaliação da CMI (NCCS, 2015). Procedeu-se também à avaliação da concentração mínima bactericida (CMB) por inoculação das culturas onde não foi observado crescimento microbiano, em meio MHA a 37 °C durante 24 horas (Martins *et al.*, 2014). Paralelamente, para o estudo do crescimento de células viáveis procedeu-se à avaliação da atividade de desidrogenases, utilizando o reagente *p*-iodonitrotetrazólio (INT) (Bag & Chattopadhyay, 2015). As desidrogenases são enzimas oxirredutases que transportadoras de elétrons para as enzimas NAD⁺ ou NADP⁺. O INT compete com estas enzimas, interferindo com a cadeia respiratória da célula. Este, quando reduzido, forma iodonitrotetrazólio-formazão (INTF) (Figura 3), um composto de coloração vermelha (Mosher *et al.*, 2003). Preparou-se uma solução aquosa de INT a 0,4 mg/mL e adicionaram-se 20 μ L desta solução às microplacas, as quais foram novamente incubadas a 37 °C durante uma hora. Posteriormente, procedeu-se à leitura da absorvância a 490 nm para avaliação da concentração de INTF formado (Baldovini *et al.*, 2005).

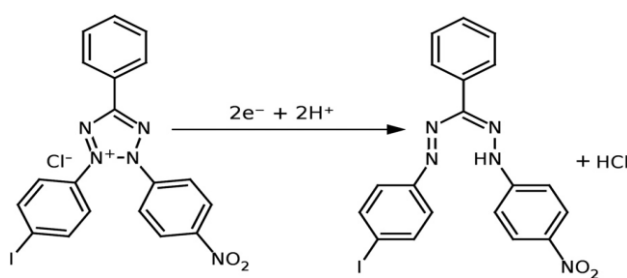


Figura 10 Reação de redução do INT a INTF na presença de desidrogenases viáveis (Adaptado de Maldonado *et al.*, 2012).

4.6.4. Avaliação do efeito sinérgico dos óleos essenciais

A avaliação do efeito sinérgico dos OEs em estudo foi realizada através do método de *checkerboard* (Bassolé & Juliani, 2012). As soluções de OE nas concentrações entre 1,5 e 4 µL/mL foram preparadas seguindo a metodologia descrita nos ensaios de avaliação do crescimento em meio líquido. As restantes soluções (0,015 a 1,0 µL/mL) foram efetuadas através de diluições seriadas de 1:2 utilizando meio suplementado com DMSO (10 %) e *tween* 80 (5 %).

Os resultados foram analisados com o mesmo procedimento descrito para os ensaios em meio líquido, com determinação dos valores de CMI, CMB e viabilidade celular.

O ensaio *checkerboard* permite também avaliar o tipo de interação que ocorre entre as soluções de OE através do cálculo do índice FIC (concentração inibitória fracionada), que nos dá uma ideia da interação presente e do efeito da mistura de OEs. Para o efeito $FIC_{index} = FIC_A + FIC_B$, onde FIC_A e FIC_B correspondem ao índice FIC obtido para o OE A e B, respetivamente (Grbić *et al.*, 2018). O índice FIC de cada OE em isolado é calculado através da seguinte fórmula: $FIC_{OE} = CMI \text{ do OE em mistura} / CMI \text{ do OE em isolado}$ (Zengin & Baysal, 2014). A interação dos OEs em mistura foi considerada efeito sinérgico para quando $FIC \leq 0,75$, efeito aditivo com valores de FIC entre 0,75 e 4 e efeito antagónico para valores de FIC superiores a 4. O efeito sinérgico foi dividido em duas classificações, segundo o valor de FIC: $FIC \leq 0,5$ sinérgismo total e $0,5 < FIC \leq 0,75$ sinérgismo parcial (Gallucci *et al.*, 2009).

4.6.5. Avaliação do efeito dos óleos essenciais nas culturas bacterianas em citometria de fluxo

A mistura de OEs com resultados mais promissores nos ensaios de atividade antibacteriana em meio líquido (*C. nepeta/L. pedunculata*) foi selecionada para a avaliação do efeito dos OEs em populações bacterianas gram-positivas (*E. faecalis* ATCC 29212 e *S. aureus* LFG 1007) e gram-negativas (*E. coli* LFG 1003 e *P. aeruginosa* LFG 1002), em citometria de fluxo. Este estudo tem como finalidade quantificar o decréscimo populacional da população microbiana, assim como avaliar as populações

de células apoptóticas e de células viáveis nas concentrações testadas, com vista a inferir sobre os mecanismos de ação antimicrobiana dos OEs em estudo.

Primeiramente, foi realizado um ensaio em meio líquido seguindo o mesmo procedimento do ensaio de determinação de CMI e CMB, com adição de 40 µL de OE de *C. nepeta* e 40 µL de OE de *L. pedunculata*, de cada uma das concentrações testadas (3 µL/mL a 0,06 µL/mL) e adicionou-se 80 µL de suspensão bacteriana em estudo. Após o período de incubação, foram determinados os valores de CMI e CMB. Posteriormente, o conteúdo de cada poço foi transferido para *ependorfs*, os quais foram centrifugados a 13 000 g na temperatura 4 °C, durante 15 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e ressuspenderam-se as células com 200 µL de PBS 10x. Realizou-se uma nova centrifugação nas mesmas condições. Seguidamente, desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se as células com 100 µL de PBS 10x/BSA 1%. Adicionou-se 50 µL de *Anexin V kit* e 0,5 µL de Pi a todas as amostras. O ensaio foi realizado num citómetro Muse® Cell Analyzer. Em cada análise foram contabilizados 1000 eventos. Os resultados foram analisados recorrendo ao Flowing Software 2.5.1.

As amostras foram também analisadas por microscopia de epifluorescência no microscópio BA410E Motic equipado com um conjunto de filtros Cy3 (excitação D540/25x, espelho dicróico 565DCLP e emissão D605/55m), FITC (excitação D480/30x, espelho dicróico 505DCLP e emissão D535/40m) e Cy5 (excitação D436/20x, espelho dicróico e emissão D480/40m). As imagens foram capturadas pela câmara Moticam PRO 282B e analisadas pelo *software* Motic Images Plus 2.0^{LM}.

4.7. Avaliação da letalidade em *Artemia salina*

A toxicidade dos OEs foi primeiramente estudada face a *Artemia salina*, com determinação da concentração letal para 50% da população (CL₅₀). Este ensaio foi realizado em concordância com as indicações de Artoxkit MTM, com algumas modificações. Os ovos de *A. salina* foram colocados a eclodir numa solução salina, num local escuro a 25 °C, durante 24 h. Posteriormente, as larvas foram transferidas para nova solução salina e novamente incubadas durante 24 h.

Foram avaliadas soluções de OE com concentrações entre 0,078 e 10 mg/mL, preparadas a partir de uma solução de OE a 10 mg/mL, em diluições seriadas com água do mar sintética suplementada com DMSO (10%) e *Tween* 20 (1%). Foi também

efetuado um ensaio de controlo com solução padrão de dicromato de potássio (K_2CrO_7) em concentrações entre 100 e 1000 $\mu\text{g/mL}$. O composto padrão (K_2CrO_7) foi preparado em soluções aquosas contendo DMSO 10%. O ensaio foi realizado em placa de 24 poços, com nove réplicas para cada concentração. A cada poço da placa foram adicionados 900 μL de água do mar sintética, 100 μL de solução de concentração a testar e 10 *A. salina*. As placas foram incubadas durante a 25 °C, durante 24 h. Foi efetuada a contagem do número de artémias mortas num sistema estereoscópico (Olympus SZX9) e elaborada a curva dose-resposta para determinação do valor de CL_{50} , através do *software* Origin 8.

4.8. Avaliação da toxicidade “*in vivo*”

A avaliação da toxicidade dos OEs *in vivo* foi determinada a dose letal para 50 % da população (DL_{50}), através de administração por via oral em ratinhos *Swiss*, segundo as normas OECD, pelo procedimento padrão “*Up and Down*” (OECD, 2001) com avaliação dos parâmetros: catalepsia, reflexos posturais, reflexo pineal, teste de sensibilidade na cauda e atividade motora (Vogel & Vogel, 2013). A determinação do valor de DL_{50} foi calculada através do *software* AOT425StatPgm (OECD, 2001).

Foram formados grupos constituídos por três ratinhos, os quais foram alimentados com ração e água *ad libitum* e colocados em jejum durante as 16h antecedentes ao ensaio. Seguidamente, cada um dos grupos foram administrados via oral com uma concentração de OE de 2000 mg/kg. Quando não foram observadas mortes considerou-se o valor de DL_{50} superior a 2000 mg/kg. Quando foi observada uma ou mais mortes, o ensaio foi repetido, utilizando metade da concentração previamente testada. O manuseamento dos animais foi realizado por um investigador credenciado pela Direção Geral de Veterinária e pela FELASA, seguindo as recomendações do Comité de Ética.

5. Resultados e discussão

5.1. Caracterização química dos óleos essenciais

Na tabela 4 apresentam-se os valores de rendimento de extração, massa volúmica e índice de refração dos OEs obtidos das plantas em estudo.

Tabela 4 Valores de rendimento de extração, massa volúmica e índice de refração dos óleos essenciais em estudo.

Óleo essencial	Rendimento de extração (%)	Massa volúmica (g/cm ³)	Índice de refração (n_d)
<i>C. nepeta</i>	0,44 ± 0,03	0,930 ± 0,001	1,46 ± 0,01
<i>L. luisieri</i>	0,75 ± 0,07	0,942 ± 0,001	1,47 ± 0,01
<i>L. pedunculata</i>	0,28 ± 0,05	0,956 ± 0,002	1,47 ± 0,01
<i>L. viridis</i>	0,33 ± 0,06	0,925 ± 0,008	1,48 ± 0,01
<i>M. pulegium</i>	0,21 ± 0,03	0,903 ± 0,001	1,48 ± 0,01
<i>M. spicata</i>	0,46 ± 0,02	0,929 ± 0,003	1,48 ± 0,01
<i>O. vulgare</i>	0,11 ± 0,02	0,909 ± 0,010	1,42 ± 0,01

O processo de hidrodestilação apresentou rendimentos de extração inferiores a 1%, tendo sido a espécie de *L. luisieri* a que apresentou um maior rendimento de extração. O baixo rendimento de extração de OEs é comum em sistemas de hidrodestilação convencional, como o sistema *Clevenger*, devido à volatilização do OE (Gavahian *et al.*, 2012). Contudo, este processo apresenta como vantagem a obtenção de OEs mais concentrados e o facto de evitar a aglomeração do material vegetal (Asbahani *et al.*, 2015). A massa volúmica dos OEs variou entre 0,909 e 0,956 g/cm³.

O índice de refração é um parâmetro que permite avaliar uma propriedade física que permite avaliar o conteúdo em sólidos solúveis e a massa de água e que representa a relação entre o ângulo de incidência e o ângulo de refração, quando um feixe de luz passa de um meio menos denso para um meio com densidade superior. Este parâmetro é constante nos OEs, permitindo avaliar a sua pureza (Hong *et al.*, 2004). Os OEs em estudo apresentaram índices de refração muito próximos, compreendidos entre 1,42 e 1,48. Geralmente, o índice de refração dos OEs puros deve de encontrar-se entre 1,45 e 1,59 (Pauli & Schilcher, 2010).

A caracterização química dos OEs foi realizada por GC-FID. Os resultados relativos aos grupos de compostos presentes na composição química dos

OEs de *C. nepeta*, *M. pulegium*, *M. spicata* e *O. vulgare* encontram-se na tabela 5 e os resultados relativos aos OEs de género *Lavandula* encontram-se na tabela 6.

Tabela 5 Grupos de componentes químicos obtidos nos óleos essenciais de *C. nepeta*, *M. pulegium*, *M. spicata* e *O. vulgare*.

Grupos de componentes	% (média ± DP)			
	<i>C. nepeta</i>	<i>M. pulegium</i>	<i>M. spicata</i>	<i>O. vulgare</i>
Monoterpenos hidrocarbonados (MH)	3,35 ± 0,14	0,93 ± 0,04	11,87 ± 2,67	49,16 ± 2,5
Monoterpenos oxigenados (MO)	87,97 ± 0,83	97,08 ± 0,93	84,31 ± 5,22	47,57 ± 2,4
Sesquiterpenos hidrocarbonados (SH)	2,45 ± 0,23	-	2,22 ± 0,01	2,84 ± 0,1
Sesquiterpenos oxigenados (SO)	-	0,81 ± 0,08	0,98 ± 0,07	-
Total identificado (%)	93,77 ± 1,20	99,01 ± 0,15	99,38 ± 0,12	99,6 ± 4,9

Tabela 6 Grupos de componentes químicos obtidos nos óleos essenciais de *L. luisieri*, *L. pedunculata* e *L. viridis*.

Grupos de componentes (%)	% (média ± DP)		
	<i>L. luisieri</i>	<i>L. pedunculata</i>	<i>L. viridis</i>
Monoterpenos hidrocarbonados (MH)	6,17 ± 0,15	17,67 ± 0,61	10,65 ± 0,11
Monoterpenos oxigenados (MO)	78,86 ± 3,36	79,91 ± 1,47	82,02 ± 0,46
Sesquiterpenos hidrocarbonados (SH)	6,54 ± 0,66	-	1,36 ± 0,26
Sesquiterpenos oxigenados (SO)	4,89 ± 0,16	0,85 ± 0,03	3,67 ± 0,09
Total identificado (%)	96,46 ± 4,32	98,43 ± 2,11	97,69 ± 0,92

Os OEs em estudo apresentaram uma composição química diversificada, sendo coincidente para todos o elevado teor em monoterpenos oxigenados (79 – 97%), com exceção do OE de *O. vulgare* que apresentou 48% de monoterpenos oxigenados.

A caracterização química dos OEs de *C. nepeta*, *M. pulegium*, *M. spicata* e *O. vulgare* apresenta-se na tabela 7.

Tabela 7 Caracterização química dos óleos essenciais de *C. nepeta*, *M. pulegium*, *M. spicata* e *O. vulgare* por GC-FID (coluna Supelcovax™ 10).

Componentes	Grupo	Índice de retenção (IR) ^a	% (média ± DP)			
			<i>C.nepeta</i>	<i>M. pulegium</i>	<i>M. spicata</i>	<i>O. vulgare</i>
β - Tujeno	MH	919	-	-	-	1,0 ± 0,05
α - Terpineno	MH	1011	-	-	-	2,6 ± 0,13
M - Cimeno	MH	1018	-	-	-	13,0 ± 0,65
α - Pineno	MH	1028	0,42 ± 0,01	0,32 ± 0,01	1,18 ± 0,03	-
E-o-Cimeno	MH	1037	-	-	-	6,6 ± 0,33
Canfeno	MH	1071	0,81 ± 0,01	-	0,55 ± 0,01	-
β - Pineno	MH	1116	-	0,23 ± 0,01	0,97 ± 0,02	-
Sabineno	MH	1126	-	-	-	-
β - Mirceno	MH	1162	-	-	0,74 ± 0,08	1,7 ± 0,09
α- Felandreno	MH	1165	1,85 ± 0,05	-	-	-
Limoneno	MH	1215	-	0,28 ± 0,01	7,41 ± 0,07	-
1,8-Cineol	MO	1217	9,35 ± 0,22	0,14 ± 0,02	12,14 ± 0,07	5,3 ± 0,27
Metil-timol	MO	1238	-	-	-	17,7 ± 0,89
β- Terpineno	MH	1242	-	-	-	-
Y-Terpineno	MH	1251	-	-	-	21,6 ± 1,08
trans-Cariofileno	SH	1397	-	-	-	2,0 ± 0,1
Fenchona	MO	1420	-	1,12 ± 0,05	-	-
Germacreno-D	SH	1462	-	-	-	1,5 ± 0,08
Hidrato de sabineno	MO	1464	0,28 ± 0,01	-	-	-
Mentona	MO	1465	12,91 ± 0,31	0,23 ± 0,01	-	-
γ - Elemeno	SH	1478	-	-	-	1,7 ± 0,09
Isomentona	MO	1490	1,84 ± 0,01	4,90 ± 0,10	2,38 ± 0,05	-
β - Bisablene	SH	1510	-	-	-	2,6 ± 0,13
Acetato de linalilo	MO	1558	-	-	-	-
Isopulegol	MO	1562	1,21 ± 0,01	0,66 ± 0,01	-	-
Isopulegona	MO	1575	33,12 ± 0,04	-	-	-
Pinocarvona	MO	1578	-	0,54 ± 0,01	-	-
β- Cariofileno	SH	1600	2,45 ± 0,23	-	2,22 ± 0,01	-
4-Terpineol	MO	1606	2,74 ± 0,06	-	7,17 ± 0,02	-
Pulegona	MO	1643	21,72 ± 0,02	79,71 ± 0,58	-	1,9 ± 0,09
Mentol	MO	1645	-	-	0,63 ± 0,02	-
trans-Pinocarveol	MO	1659	4,8 ± 0,15	-	-	-
Isoborneol	MO	1665	-	-	1,20 ± 0,03	-
Acetato de terpenilo	MO	1760	-	0,48 ± 0,01	-	-
Carvona	MO	1760	-	-	56,61 ± 0,51	-
Acetato de geranilo	MO	1766	-	-	0,69 ± 0,01	-
Geraniol	MO	1886	-	-	1,19 ± 0,04	-
Óxido de cariofileno	SO	1969	-	0,81 ± 0,08	0,98 ± 0,07	-
Timol	MO	2177	-	-	-	20,8 ± 1,04
Carvacrol	MO	2207	-	0,14 ± 0,01	2,30 ± 0,09	-

Legenda: a – Índices de retenção relativos a *n*-alcanos C8 – C22 na coluna Supelcovax™ 10.

O OE de *C. nepeta* apresentou como constituintes majoritários isopulegona (33,12%), pulegona (21,72%), mentona (12,91%) e 1,8-cineol (9,35%). O OE de *M. pulegium* apresentou como compostos majoritários a pulegona (79,71%) e a isomentona (4,90%). Os componentes majoritários obtidos no OE de *M. spicata* foram carvona (56,61%), 1,8-cineol (12,14%), mirceno (7,41%) e 4-terpineol (7,17%). O OE de *O. vulgare* apresentou como compostos majoritários γ -terpineno (21,6%), timol (20,8%), metil-timol (17,7%) e M-cimeno (13,0%). O OE de *L. luisieri* em estudo apresentou compostos derivados do necrodano como compostos majoritários, nomeadamente, acetato de α -necrodilo (20,49%) e α -necrodol (8,38%). Este OE também apresentou como compostos majoritários 4-terpineol (15,88%), 1,8-cineol (10,94%) e isoborneol (5,73%). O OE de *L. pedunculata* apresentou como compostos majoritários fenchona (44,05%), cânfora (20,90%), α -pineno (5,52%) e limoneno (5,25%). A composição química obtida no OE de *L. viridis* foi caracterizada pelos compostos majoritários 1,8-cineol (49,17%), cânfora (12,36%), linalol (7,23%) e α -pineno (6,83%).

O OE de *C. nepeta* é distinguido pelo seu polimorfismo químico e variabilidade intraespecífica. Contudo, a maioria destes OEs têm em comum a predominância de monoterpenos, pertencentes às unidades oxigenadas C-3 *p*-mentanos, como a pulegona (Baldovini *et al.*, 2005; Božović *et al.*, 2017). Negro *et al.* (2013) relataram a variabilidade intraespecífica de OEs de *C. nepeta* originária de Itália, ao identificar quatro quimiotipos distintos através dos seus componentes majoritários, designadamente, óxido de piperitona/óxido de piperitenona, óxido de piperitonona, piperitonona/mentona e pulegona/mentona. Estudos de Marongiu *et al.*, (2010) sobre a *C. nepeta* portuguesa revelaram a presença de um quimiotipo diferente, majoritariamente composto por isomentona, 1,8-cineol e *trans*-isopulegona. Neste estudo é também relatada a diferença na composição química dos OEs quando utilizados dois métodos de extração de OE diferentes, hidrodestilação e extração através de fluído supercrítico. Os autores reportam diferenças na composição química devido à solubilidade de alguns componentes em água, resultando numa extração menos eficiente dos mesmos. Baldovini *et al.* (2000) estudaram a evolução do OE de *C. nepeta* de origem francesa, durante o ciclo vegetativo da PAM (desde maio até novembro). Durante todo o estudo ocorreu a predominância de pulegona (63-78%), contudo, a partir do mês de setembro é observada uma diminuição progressiva deste composto, acompanhada pelo aumento de mentona (8,7- 37,4%), sugerindo uma correlação negativa entre os dois compostos.

De acordo com a bibliografia, os OEs de *M. pulegium* apresentam elevada variabilidade na composição química, onde os componentes majoritários são pulegona, mentona, piperitona, piperitenona e mentol (Brahmi *et al.*, 2017). Estudos de Teixeira *et*

al., (2013) relativos a *M. pulegium* do centro de Portugal revelaram que o OE desta PAM é constituídos essencialmente por mentona e pulegona. Num outro estudo o OE de *M. pulegium* da mesma região, apresentou como composto maioritário a pulegona, com cerca de 80% (Reis-Vasco *et al.* (1999). Mata *et al.*, (2007) referem que o OE de *M. pulegium* do leste de Portugal apresenta pulegona e piperitona como compostos maioritários Boukhebt *et al.* (2011) apresentam um quimiotipo de *M. pulegium* da Algeri contendo como compostos maioritários, pulegona, mentona, piperitona, isomentona e limoneno. Díaz-maroto *et al.* (2007) realizou um estudo sobre *M. pulegium* de Espanha, no qual obteve OE com compostos maioritários pulegona e óxido de piperitona em todas as amostras. Ait-ouazzou *et al.*, (2012) estudaram OE de *M. pulegium* de origem marroquina, o qual apresentou como compostos maioritários pulegona, piperitona, isopulegona e óxido de *cis*-piperitona. Neste estudo, a pulegona foi o composto mais abundante do OE testado. Petrakis *et al.* (2009) analisaram várias amostras de OE de *M. pulegium* da Grécia, nas quais obtiveram como componente maioritário a pulegona, seguida de isomentona, mentona, piperitona e *cis*-isopulegona. Em uma amostra, os autores detetaram que o componente maioritário foi a piperitona, seguida de isomentona.

Na bibliografia, são referidos vários quimiotipos de OE de *M. spicata*, de acordo com os seus compostos maioritários, nomeadamente, carvona, pulegona, linalol, piperitona, óxido de piperitona, mentona/isomentona, pulegona/mentona/isomentona e pulegona/piperitona (Hua *et al.*, 2011; Snoussi *et al.*, 2015). Estudos realizados por Martins *et al.* (2012) sobre OEs de *M. spicata* portuguesa (Alentejo) apresentaram a carvona e o limoneno como compostos maioritários. Vian *et al.* (2008) estudaram a composição química de OEs de *M. spicata*, obtida no mercado local (França), recorrendo a dois métodos de extração. Para ambos os métodos de extração os OEs apresentaram a carvona como composto maioritário, seguida de *cis*-carveol e limoneno. Estudos de Soković *et al.* (2010) relativos a *M. spicata* originária na Sérvia, demonstraram como compostos maioritários carvona, mentona e limoneno. Hua *et al.* (2011) estudaram várias amostras de *M. spicata* originária de vários locais da China. Os autores reportam a existência de diferentes quimiotipos entre as amostras. A maioria dos OEs de *M. spicata* apresentam carvona como composto maioritário. Os autores relatam também a presença de óxido de piperitona como composto maioritário de pulegona como composto maioritário em 2 outras amostras de *M. spicata*. Estudos de Snoussi *et al.* (2015) relativos a OE de *M. spicata* da Tunísia descrevem um quimiotipo carvona/limoneno que contém vários compostos maioritários, nomeadamente, carvona, limoneno, 1,8-cineol, β -pineno, *cis*-hidrocarvona e *cis*-hidrocarveol.

Estudos de Teixeira *et al.*, (2013) relativos a OE de *O. vulgare* originário em Portugal (Ribatejo) apresentaram como compostos maioritários do OE carvacrol, timol, álcool de β -fenchilo e α -terpineol. Azizi *et al.* (2009), estudaram OEs de populações de *O. vulgare* da Alemanha, as quais apresentaram como composto maioritário o carvacrol, com concentração acima de 70%. Neste estudo foram também obtidas concentrações significativas de γ -terpineno e *p*-cimento em todas as amostras. D'Antuono *et al.* (2000) estudaram amostras de OE de *O. vulgare* oriundas de Itália, as quais apresentaram variabilidade na composição química e foram divididas em três quimiotipos, designadamente, grupo da via biossintética carvacrol/timol, grupo com elevado conteúdo em linalol e sesquiterpenos e grupo caracterizado pelo elevado conteúdo em sesquiterpenos. Mockute *et al.* (2001) realizaram estudos a amostras de OE originário de PAMs colhidas na Lituânia, as quais têm em comum o elevado conteúdo em β -O-cimeno, seguido de germacreno-D, β -cariofileno e sabineno. Estudos realizados por Sahin *et al.* (2004) a OE de *O. vulgare* originário na Turquia apresentaram uma composição química diversificada, tendo sido obtidos como compostos maioritários cariofileno, espatulenol, germacreno-D e α -terpineol. Segundo os mesmos autores, são conhecidos dois quimiotipos deste OE, nomeadamente, carvacrol/timol e germacreno-D/terpine-4-ol.

A caracterização química dos OEs de *L. luisieri*, *L. pedunculata* e *L. viridis* apresenta-se na tabela 8.

Os OEs de PAMs do género *Lavandula* são caracterizados pela sua composição química complexa constituída por monoterpenos e sesquiterpenos oxigenados, esterres, óxidos e cetonas (Woronuk *et al.*, 2011). De modo geral, a composição química destes OEs apresenta por linalol, acetato de linalilo e 1,8-cineol, onde as concentrações destes compostos dependem entre espécies (Roller *et al.*, 2009).

OEs de *L. luisieri* apresentam uma composição química particular, onde são encontrados compostos monoterpénicos irregulares derivados de necrodano. Estes compostos são extremamente raros na natureza e apenas foram anteriormente isolados a partir de um besouro sul americano (*Necrodes surinamensis*) e de *L. luisieri* (Lavoine-Hanneguelle & Casabianca, 2004). Arantes *et al.*, (2016) estudaram OE de *L. luisieri* portuguesa da região Alentejo, a qual apresentou como componentes maioritários 1,8-cineol, acetato de *trans*- α -necrodilo, lavandulol e *E*-cariofileno. Neste estudo, os compostos derivados de necrodano predominaram a composição química do OE.

Tabela 8 Caracterização química dos óleos essenciais de *L. luisieri*, *L. pedunculata* e *L. viridis* por GC-FID (coluna Sulpecovax™ 10).

Componentes	Grupo	Índice de retenção (IR) ^a	% (média ± DP)		
			<i>L. luisieri</i>	<i>L. pedunculata</i>	<i>L. viridis</i>
α - Pineno	MH	1028	1,16 ± 0,04	5,52 ± 0,06	6,83 ± 0,07
Canfeno	MH	1071	0,42 ± 0,01	-	2,02 ± 0,02
β - Pineno	MH	1116	4,02 ± 0,09	2,04 ± 0,24	1,80 ± 0,02
α- Terpineno	MH		-	4,86 ± 0,13	-
Limoneno	MH	1215	-	5,25 ± 0,18	-
1,8-Cineol	MO	1217	10,94 ± 0,26	0,79 ± 0,08	49,17 ± 0,13
Fenchona	MO	1408	2,24 ± 0,07	44,05 ± 0,08	-
Hidrato de sabineno	MO	1464	-	-	0,96 ± 0,01
Cânfora	MO	1515	0,92 ± 0,02	20,90 ± 0,05	12,36 ± 0,13
Linalol		1532	3,63 ± 0,15	3,37 ± 0,11	7,23 ± 0,02
Pinocarvona	MO	1562	-	2,34 ± 0,09	-
Acetato de α- Necrodilo	MO	1590	20,49 ± 0,51	-	-
Acetato de Bornilo	MO	1597	-	2,25 ± 0,20	0,92 ± 0,01
β - Cariofileno	SH	1600	5,78 ± 0,61	-	-
Acetato de lavandulilo	MO	1603	4,26 ± 0,25	-	-
4-Terpineol	MO	1606	15,88 ± 0,27	0,72 ± 0,44	-
allo-Aromadendreno	SH	1637	0,76 ± 0,05	-	-
Verbenol	MO	1648	-	-	1,09 ± 0,01
α - Necrodol	MO	1657	8,38 ± 0,88	-	-
Isoborneol	MO	1668	5,73 ± 0,53	-	1,02 ± 0,01
Lavandulol	MO	1677	1,01 ± 0,22	-	-
Acetato de Mirtenilo	MO	1680	0,78 ± 0,03	-	-
Borneol	MO	1695	0,60 ± 0,02	1,35 ± 0,12	-
Verbenona	MO	1704	-	2,90 ± 0,28	
α-Terpineol	MO	1711	0,40 ± 0,07	1,23 ± 0,10	4,36 ± 0,06
α-Selineno	SH	1717	-	-	1,36 ± 0,26
Acetato de nerilo	MO	1720	0,84 ± 0,01	-	-
Acetato de terpinilo	MO	1760	1,89 ± 0,06	-	2,02 ± 0,02
Acetato de geranilo	MO	1766	-	-	2,89 ± 0,05
Mirtenol	MO	1803	0,87 ± 0,01	-	-
Óxido de cariofileno	SO	1969	0,71 ± 0,02	0,85 ± 0,03	0,93 ± 0,03
Viridiflorol	SO	2073	2,79 ± 0,10	-	-
α-Copaene-8-ol	SO	2078	0,81 ± 0,02	-	-
A-Cadinolol	SO	2221	0,58 ± 0,01	-	2,74 ± 0,06

Legenda: a – Índices de retenção relativos a C8 – C22 n-alcenos na coluna Sulpecovax™ 10.

Noutro estudo relativo a OEs de *L. luisieri* originária do centro e sul de Portugal é igualmente relatado o elevado conteúdo em derivados de necrodano na composição do OE (Zuzarte *et al.*, 2012). Neste estudo foram relatadas diferenças significativas entre os componentes maioritários dos OEs, nomeadamente, 1,8-cineol (6,4% vs 33,9%), fenchona (0% vs 18,2%) e acetato de *trans*-α-necrodilo (17,4% vs 3,2%). De modo concordante com restantes estudos sobre *L. luisieri autóctone* de Portugal, González-Coloma *et al.*, 2011 encontraram uma composição química rica em acetato de *trans*-α-

necrodilo, β -selineno, *trans*- α -necrodol, fenchona, cineol, viridiflorol e cânfora. Estudos de Sanz *et al.*, (2004) relativos a OE de *L. luisieri* espanhola originários de folhas e flores da PAM, relatam a predominância de cânfora e 1,8-cineol em OE proveniente das folhas e cânfora, 1,8-cineol e fenchona em OE proveniente das flores. Contrariamente aos estudos do OE português, em todas as amostras testadas foram obtidas concentrações de cetonas e derivados de necrodilo reduzidas.

De acordo com a bibliografia, três quimiotipos de OE de *L. pedunculata* de acordo com os compostos maioritários, nomeadamente, 1,8-cineol, 1,8-cineol/cânfora e fenchona (Zuzarte *et al.*, 2010). Costa *et al.*, (2013) descreve a presença de um quimiotipo principal do OE de *L. pedunculata* caracterizado pela presença de 1,8-cineol, o qual se divide em dois sub-grupos que diferem entre si de acordo com a concentração do OE neste composto e em cânfora. Benabdelkader *et al.*, (2015) realizaram um estudo sobre o OE desta PAM originária no ocidente de Portugal, onde descrevem a presença do quimiotipo rico em fenchona, no qual este composto juntamente com a sua forma reduzida, fenchol, completavam 48% da composição química do OE. Este OE apresentou também 1,8-cineol como componente maioritário. Matos *et al.* (2009) realizaram um estudo com OE de *L. pedunculata* do sul de Portugal, no qual obtiveram como componentes maioritários a fenchona e a cânfora. De modo concordante, num outro estudo sobre *L. pedunculata* do sul de Portugal realizado por Costa *et al.* (2015), são reportados como componentes maioritários fenchona e cânfora. Apesar de serem observadas algumas diferenças no conteúdo dos compostos minoritários, os resultados obtidos são concordantes com os estudos apresentados relativos às espécies portuguesas. Segundo Aprotosoiaie *et al.* (2017) vários estudos revelam concentrações em cânfora nos OEs de *L. pedunculata* portuguesa e espanhola. Estudos de Bouazama *et al.*, (2017) realizados a OE de *L. pedunculata* marroquina descrevem a constituição química do OE rica em cânfora, canfeno e 1,8-cineol.

A composição química de OEs de *L. viridis* de origem portuguesa e espanhola apresenta elevada homogeneidade, tendo como compostos maioritários 1,8-cineol e cânfora (Lis-Balchin, 2003). A composição química obtida neste OE é concordante com estes estudos, apresentando elevada concentração em 1,8-cineol (49,17%) e cânfora (12,36%). De modo concordante, Matos *et al.*, (2009) realizaram um estudo sobre *L. viridis* do sul de Portugal, contudo, apenas reporta 1,8-cineol e cânfora como componentes maioritários. Por outro lado, Costa *et al.* (2015) apresenta o OE de *L. viridis* da mesma região constituído maioritariamente por cânfora. Zuzarte *et al.*, (2011) descrevem o OE de *L. viridis* portuguesa com mais do que dois compostos maioritários, nomeadamente, 1,8-cineol, cânfora, α -pineno e linalol. Estudos de Nogueira & Romano

(2002) sobre *L. viridis* do sul de Portugal e amostras desta planta obtida através de micropropagação reportam que em todas as espécies os componentes majoritários desta PAM são coincidentes, nomeadamente, 1,8-cineol, cânfora, borneol e α -terpineol. Num estudo semelhante sobre esta PAM colhida na mesma região, Gonçalves *et al.*, (2008) apenas reportam 1,8-cineol e cânfora como os componentes majoritários de todos os OEs analisados.

5.2. Avaliação da sensibilidade microbiana

Para a análise da sensibilidade dos microrganismos aos OEs foi realizado o ensaio de difusão em meio sólido. Na tabela 9 encontram-se apresentados os halos de inibição obtidos face às estirpes bacterianas. De modo geral, os OEs apresentaram elevado potencial inibitório do crescimento das estirpes bacterianas em estudo.

Comparativamente aos OEs estudados, o OE de *O. vulgare* revelou maior eficácia, com atividade extrema face a todos os microrganismos estudados, apresentando inibição total do crescimento de todos os microrganismos estudados, exceto a estirpe *P. aeruginosa* LFG 1002, para a qual apresentou um halo de inibição de 9,6 mm. Estes resultados estão em concordância com estudos de Dorman & Deans (2000) que apresentam uma elevada eficácia do OE de *O. vulgare* face a 25 estirpes bacterianas patogénicas. Lambert *et al.* (2001) relatam que este OE altera a integridade da membrana bacteriana e afeta a homeostase do pH e, conseqüentemente, o equilíbrio iónico da célula.

Os OEs de *C. nepeta* e *M. spicata* apresentaram eficácia face a um largo número de estirpes bacterianas, com valores de halos de inibição acima de 9,1 mm, não tendo apenas apresentado atividade para a estirpe *P. aeruginosa* LFG 1002. Esta espécie bacteriana é conhecida pela frequente aquisição de resistência a agentes antimicrobianos (Aloush *et al.*, 2006).

Segundo Cavanagh & Wilkinson (2005), os OEs de *Lavandula* são eficazes face a estirpes resistentes a antimicrobianos utilizados na clínica, tais como, *S. aureus* MRSA e *Enterococcus* VRE. Este resultado foi observado nos ensaios realizados a *S. aureus* LFG 1007, para a qual todos os OEs foram extremamente ativos, com halos de inibição compreendidos entre 10,4 e 21,8 mm.

O OE de *L. pedunculata* é destacado pelos seus resultados muito distintos onde não apresenta qualquer atividade antibacteriana ou é extremamente ativo. A composição química deste OE é muito diversificada e vários estudos reportam o efeito sinérgico entre os seus componentes, sendo possível obter resultados diversificados para este OE (Mahboubi & Kazempour, 2009; N'dédianhoua *et al.* 2014). Este OE revelou ser extremamente ativo face às estirpes gram-positivas, com halos de inibição superiores a 16,2 mm.

Tabela 9 Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais e antimicrobiano padrão cloridrato de tetraciclina (TE-CI) face a estirpes bacterianas, representada por halos de inibição (mm).

Halo de inibição (mm)								
	<i>Calamintha nepeta</i> (5 µL)	<i>Lavandula luisieri</i> (5 µL)	<i>Lavandula pedunculata</i> (5 µL)	<i>Lavandula viridis</i> (5 µL)	<i>Mentha pulegium</i> (5 µL)	<i>Mentha spicata</i> (5 µL)	<i>Origanum vulgare</i> (5 µL)	TE-CI (30 µg)
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	i.t.	s.i.	17,4 ± 2,0	8,0 ± 0,6	18,11 ± 1,9	7,7 ± 1,9	i.t.	11,1 ± 0,5
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	26,2 ± 1,16	10,2 ± 1,0	29,9 ± 3,6	36,9 ± 5,1	25,3 ± 0,9	22,3 ± 0,9	i.t.	29,2 ± 0,4
<i>S. aureus</i> LFG 1007	i.t.	24,1 ± 3,3	24,1 ± 1,0	10,3 ± 1,2	30,7 ± 2,2	31,9 ± 2,2	i.t.	37,2 ± 0,51
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	i.t.	i.t.	16,2 ± 0,2	s.i.	17,9 ± 2,3	18,4 ± 2,3	i.t.	9,9 ± 0,5
<i>E. coli</i> ATCC 25922	24,0 ± 5,7	22,3 ± 4,5	i.t.	i.t.	17,0 ± 1,0	15,4 ± 1,6	i.t.	24,7 ± 0,6
<i>E. coli</i> LFG 1003	11,2 ± 1,7	11,9 ± 0,8	12,7 ± 0,3	s.i.	12,0 ± 0,5	9,7 ± 0,3	i.t.	6,7 ± 0,3
<i>M. morgani</i> LFG 1008	16,2 ± 1,8	21,3 ± 3,3	14,4 ± 1,0	10,6 ± 1,4	23,0 ± 3,0	i.t.	i.t.	22,3 ± 1,8
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	19,7 ± 4,7	28,4 ± 2,3	s.i.	s.i.	13,0 ± 1,0	9,1 ± 0,2	i.t.	36,7 ± 1,2
<i>P. aeruginosa</i> LFG 1002	s.i.	9,3 ± 0,6	s.i.	s.i.	10,0 ± 2,0	s.i.	9,6 ± 1,9	17,6 ± 0,5
<i>P. mirabilis</i> LFG 1004	11,1 ± 1,5	10,4 ± 3,9	21,8 ± 2,3	11,6 ± 3,5	14,0 ± 0,5	8,8 ± 1,0	i.t.	7,3 ± 0,7
<i>S. enteritidis</i> LFG 1005	14,7 ± 1,4	8,6 ± 0,2	s.i.	7,7 ± 4,4	12,0 ± 0,5	10,8 ± 0,5	i.t.	25,1 ± 0,5
<i>S. typhimurium</i> LFG 1006	12,9 ± 0,8	25,8 ± 0,5	s.i.	s.i.	11,0 ± 2,0	9,2 ± 0,8	i.t.	6,7 ± 0,3

Legenda: TE-CI – cloridrato de tetraciclina; i.t. – inibição total; s.i. – sem inibição.

O OE de *M. pulegium* é descrito na bibliografia pelo seu elevado potencial antimicrobiano em ensaios de difusão em meio sólido. Este facto é particularmente verificado face a estirpes bacterianas gram-positivas (Ait-ouazzou *et al.*, 2012; Hajlaoui *et al.*, 2009).

Os OEs de *C. nepeta*, *L. pedunculata*, *L. viridis* e *M. spicata* apresentaram maior atividade face a estirpes gram-positivas. Este facto está associado com a interação do OE diretamente com a membrana celular, devido a estirpes bacterianas não possuírem

membrana exterior composta por lipossacarídeos (Yap *et al.*, 2013). Por outro lado, o OE de *L. luisieri* não apresenta diferenças significativas entre as estirpes gram-positivas e gram-negativas. Esta igualdade na sensibilidade dos OEs é elucidada pelo facto de a membrana lipídica apenas retardar a ação dos OEs (Fisher & Phillips, 2008). Assim, é esperado que os OEs com maior eficácia para as estirpes gram-positivas também apresentem para as restantes estirpes se o tempo de exposição ao OE for aumentado.

As estirpes de *S. aureus* foram as mais sensíveis aos OEs, comparativamente com as restantes estirpes bacterianas. Estas foram extremamente sensíveis à maioria dos OEs, com halos de inibição superiores a 22 mm. Estudos revelaram que o composto 4-terpineol, presente em diversos OEs, provoca a perda de conteúdo citoplasmático de *S. aureus* (Tserennadmid *et al.*, 2011). A estes resultados existem duas exceções, nomeadamente o OE de *L. luisieri* face a *S. aureus* ATCC 29213 e o OE de *L. viridis* face a *S. aureus* LFG 1007. No entanto, em ambos os resultados as estirpes apresentaram sensibilidade aos OEs com halos de inibição superiores a 10 mm.

Os procedimentos de difusão em meio sólido são importantes para a avaliação da atividade dos OEs. No entanto, a solubilidade do OE em água pode influenciar os resultados, reduzindo a atividade dos compostos pouco solúveis em água. Consequentemente, os OEs com elevada concentração de compostos lipofílicos apresentam halos de inibição menores. Adicionalmente, os coeficientes de difusão não são coincidentes para todos os compostos presentes nos OEs, podendo este fator afetar negativamente o resultado do ensaio (Pauli & Schilcher, 2010).

5.3. Determinação da concentração mínima inibitória e concentração mínima bactericida

Para avaliação da sensibilidade das estirpes bacterianas aos OEs, foram também realizados ensaios em meio líquido com OEs isolados, com vista à determinação dos valores de concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) de modo a poder inferir sobre o potencial bacteriostático e/ou bactericida dos OEs em estudo. Os valores de CMI foram determinados tendo em consideração três procedimentos, nomeadamente, recorrendo ao equipamento estereoscópico, determinação da turbidimetria da suspensão microbiana e

determinação da atividade das desidrogenases. Na tabela 10 apresentam-se os valores de CMI dos OEs, obtidos através dos ensaios de microdiluição em meio líquido.

Os OEs apresentaram um largo espectro de ação antibacteriano, com valores de CMI compreendidos entre 0,5 e 5,0 µL/mL para a maioria das estirpes bacterianas testadas.

Tabela 10 Valores de concentração mínima inibitória (CMI) obtidos para os óleos essenciais (OEs) e para o antimicrobiano padrão cloridrato de tetraciclina (TE-Cl) testados, face a estirpes bacterianas patogênicas.

	Valores de CMI							Padrão (µg/mL) TE-Cl
	Óleos essenciais (µL/mL)							
	<i>Calamintha nepeta</i>	<i>Lavandula luisieri</i>	<i>Lavandula pedunculata</i>	<i>Lavandula viridis</i>	<i>Mentha pulegium</i>	<i>Mentha spicata</i>	<i>Origanum vulgare</i>	
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	4,0	> 3,0	3,0	> 3,0	3,0	4,0	3,0	3,91
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	4,0	1,5	> 3,0	> 3,0	3,0	3,0	2,0	0,98
<i>S. aureus</i> LFG 1007	1,1	1,0	2,0	0,5	2,0	3,0	1,5	0,98
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	5,0	2,0	> 3,0	> 3,0	3,0	3,0	3,0	31,3
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1,6	3,0	1,5	2,0	2,0	2,0	2,0	62,5
<i>E. coli</i> LFG 1003	3,2	3,0	> 3,0	> 3,0	2,0	2,0	2,0	125,0
<i>M. morgani</i> LFG 1008	4,3	> 3,0	2,0	2,0	4,0	5,0	1,5	31,25
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	4,0	> 3,0	1,5	3,0	4,0	5,0	1,5	125,0
<i>P. aeruginosa</i> LFG 1002	0,5	0,5	3,0	3,0	3,0	4,0	1,5	1,95
<i>P. mirabilis</i> LFG 1004	4,3	1,5	1,5	1,5	3,0	3,0	3,0	62,5
<i>S. enteritidis</i> LFG 1005	3,2	> 3,0	3,0	> 3,0	3,0	3,0	2,0	1,91
<i>S. typhimurium</i> LFG 1006	3,2	3,0	> 3,0	> 3,0	3,0	4,0	3,0	62,5

Legenda: TE-CL – Cloridrato de tetraciclina.

O óleo essencial de *C. nepeta* apresentou valores de CMI reduzidos face às estirpes *S. aureus* LFG 1007 e *P. aeruginosa* LFG 1002, 1,1 e 0,5 µL/mL, respetivamente. O OE de *L. luisieri* demonstrou maior atividade face às estirpes de *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* LFG 1007, *S. epidermidis* ATCC 12228, *P. aeruginosa* LFG 1002 e *P. mirabilis* LFG 04, com valores de CMI compreendidos entre 0,5 e 2 µL/mL. O OE de *L. pedunculata* apresentou maior potencial antimicrobiano face a microrganismos gram-negativos, no entanto os valores de CMI obtidos para este OE foram elevados, encontrando-se entre 1,5 e > 3,0 µL/mL. O OE de *L. viridis* apresentou

menor eficácia na inibição do crescimento microbiano, comparativamente aos restantes OEs em estudo. No entanto, este OE revelou valores de CMI reduzidos para as estirpes *S. aureus* LFG 1007 e *P. mirabilis*, com concentrações de 0,5 e 1,5 $\mu\text{L/mL}$, respetivamente. O OE de *M. pulegium* apresentou capacidade de inibição das estirpes bacterianas, contudo, os valores de CMI obtidos foram consideravelmente elevados compreendidos entre 2,0 e 4,0 $\mu\text{L/mL}$. As estirpes bacterianas de *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* LFG 1003 e *S. aureus* LFG 1007 apresentaram maior sensibilidade a este OE, com valores de CMI de 2,0 $\mu\text{L/mL}$. De modo semelhante ao OE de *M. pulegium*, o OE de *M. spicata* apresentou potencial inibitório do crescimento das estirpes testadas, porém, com valores de CMI elevados (entre 2,0 e 5,0 $\mu\text{L/mL}$). De modo de concordante com ensaio de difusão em meio sólido, o OE de *O. vulgare* apresentou elevado potencial inibitório do crescimento bacteriano para todas as estirpes testadas, com valores de CMI compreendidos entre 1,5 e 3,0 $\mu\text{L/mL}$. As estirpes de *E. coli* foram suscetíveis ao OE, com valores de CMI de 2,0 $\mu\text{L/mL}$.

Diversos ensaios *in vitro* demonstram que os terpenos possuem potencial antimicrobiano reduzido quando aplicados em isolado, sugerindo que a sua eficácia face a microrganismos é resultante de interações sinérgicas com outros compostos presentes nos OEs (Hyldgaard *et al.*, 2012). Por outro lado, os terpenoides são agentes lipofílicos que alteram a permeabilidade da membrana celular. Adicionalmente, estes compostos reagem com mecanismos enzimáticos celulares produtores de ATP. A atividade antimicrobiana destes compostos é fortemente associada aos seus grupos funcionais (Cox *et al.*, 2000; Dagli *et al.*, 2015; Hyldgaard *et al.*, 2012).

A atividade antimicrobiana do OE de *C. nepeta* é frequentemente atribuída à elevada presença de compostos monoterpénicos. Alguns autores defendem que esta pode estar relacionada com a presença de 1,8-cineol na sua composição química, devido à atividade antimicrobiana deste composto (Božović & Ragno, 2017). Flamini *et al.*, (1999) associam a atividade antimicrobiana de *C. nepeta* exclusivamente à presença de pulegona na sua constituição. Um outro estudo também associa a atividade antibacteriana destes OEs face às estirpes de *S. aureus* e *S. typhimurium* com a elevada concentração de pulegona (Duru *et al.* 2004).

A gama de resultados diversificada obtida para os três OEs de *Lavandula* é atribuída ao facto de, apesar de estes OEs apresentarem uma composição química semelhante, os seus componentes maioritários encontram-se em diferentes concentrações, resultando num aumento ou diminuição de eficácia face a determinadas estirpes (Cavanagh & Wilkinson, 2005). Por outro lado, diversos estudos não

apresentaram uma correlação entre a concentração dos compostos majoritários e o potencial inibitório do OE, sugerindo que os componentes minoritários também desempenham uma função importante na eficácia do OE (Cavanagh & Wilkinson, 2002; Lis-Balchin *et al.*, 1998).

Contrariamente aos resultados obtidos para as restantes OEs de género *Lavandula*, o OE de *L. luisieri* apresentou maior eficácia face a estirpes gram-positivas. Este resultado é concordante com vários estudos anteriormente realizados (Arantes *et al.*, 2016; Baldovini *et al.*, 2005). OEs com elevado conteúdo em 1,8-cineol demonstraram atividade antimicrobiana face à grande maioria das estirpes bacterianas testadas (Koroch *et al.*, 2007). Tendo em consideração que o OE de *L. luisieri* em estudo apresenta na sua constituição 10,94% deste composto, é esperado que a sua atividade antibacteriana seja em parte atribuída à presença do mesmo. Zuzarte *et al.* (2012) realizaram estudos da capacidade antifúngica de vários OEs de *L. luisieri* relativamente à sua concentração em derivados de necrodano, concluindo que este composto aumentava o potencial antimicrobiano do OE.

Diversos autores atribuem a atividade antimicrobiana do OE de *L. pedunculata* à presença de 1,8-cineol e cânfora na sua composição química (Bouazama *et al.*, 2017; Zuzarte *et al.*, 2009). Nas células, a cânfora destabiliza a membrana fosfolipídica, interage com as proteínas membranares e atua como permutador protónico, reduzindo o gradiente de pH ao longo da membrana. Este composto é considerado um potente agente antimicrobiano, sendo esperado elevado potencial antibacteriano de OEs com elevada concentração de cânfora (Bouazama *et al.*, 2017). No entanto, estudos de Mahboubi & Kazempour (2009) reportam maior atividade antimicrobiana da cânfora relativamente ao OE, sugerindo a ocorrência de efeito antagónico entre os componentes do OE, que resulta numa perda de atividade do mesmo.

A menor eficácia observada pelo OE de *L. viridis*, à semelhança também do OE de *L. pedunculata*, poderá ser devida ao efeito antagónico dos seus constituintes majoritários, 1,8-cineol (49,17%) e cânfora (12,36%), referido por alguns autores (Mahboubi & Kazempour, 2009).

O OE de *L. viridis* apresentou menor eficácia na inibição do crescimento microbiano, comparativamente aos restantes OEs em estudo. No entanto, este OE revelou valores de CMI reduzidos para as estirpes *S. aureus* LFG 1007 e *P. mirabilis*, com concentrações de 0,5 e 1,5 µL/mL, respetivamente. Este OE é composto maioritariamente por 1,8-cineol (49,17%) e cânfora (12,36%). Assim, à semelhança do

OE de *L. pedunculata*, é possível ter ocorrido uma perda da atividade antimicrobiana devido ao efeito antagônico destes compostos.

Os resultados obtidos para o OE de *M. pulegium* face às estirpes de *E. coli* e de *S. aureus* são concordantes com estudos de Mahboubi & Kazempour (2009), que reportam alguma sensibilidade destas estirpes ao OE de *M. pulegium*. As estirpes *M. morganii* e *P. aeruginosa* ATCC 27853 apresentaram menor sensibilidade ao OE, para as quais se obtiveram valores de CMI de 4,0 µL/mL. A resistência de estirpes de *P. aeruginosa* ATCC foi anteriormente descrita por Boukhebt et al., (2011). O potencial bacteriostático deste OE pode ser associado a vários componentes presentes na sua constituição, particularmente, pulegona, isomentona e piperitona (Ait-ouazzou et al., 2012; Hajlaoui et al., 2009).

Segundo Shahbazi (2015), a atividade antibacteriana do OE de *M. spicata* é atribuída a vários compostos presentes no OE. No presente estudo, as estirpes mais sensíveis ao OE de *M. spicata* foram as de *E. coli* ATCC 25922 e *E. coli* LFG 1003, as quais apresentaram valores de CMI de 2,0 µL/mL. Estudos de Helander & Alakomi (1998) confirmam a suscetibilidade desta estirpe bacteriana à carvona. Contudo, os autores não detetaram interação deste composto com a membrana celular bacteriana, concluindo que, por esse motivo, a carvona não apresenta elevada eficácia face a estirpes bacterianas. Assim, o potencial inibitório deste OE pode estar dependente do dano causado na membrana por outros compostos.

Estudos de Aggarwal et al. (2002) sugerem que o potencial antimicrobiano de *M. spicata* está associado ao efeito sinérgico estabelecido entre os componentes minoritários do OE. O OE de *M. spicata* apresenta carvacrol na sua composição, um monoterpenoide reconhecido pelas suas propriedades antibacterianas. Segundo a bibliografia, este composto destabiliza a membrana citoplasmática e altera o gradiente de pH. Este fenómeno provoca o colapso da bomba protónica, levando à morte celular (Veldhuizen et al. 2006). O OE de *M. spicata* em estudo apenas apresenta 2,30% de carvacrol na sua constituição. Assim, o elevado valor de CMI obtido pode também estar associado à reduzida concentração de carvacrol presente no OE.

Teixeira et al., (2013) descrevem que o OE de *O. vulgare* interage com a barreira de peptidoglicano desta estirpe bacteriana, diminuindo o número de péptidos funcionais na membrana. A atividade antimicrobiana do OE de *O. vulgare* encontra-se fortemente associada à sua elevada concentração de compostos fenólicos, os quais têm a capacidade de dissolver a membrana celular e, conseqüentemente, introduzir-se na célula, interagindo com os mecanismos enzimáticos do microrganismo (Souza et al.,

2007). Contudo, a interação entre compostos minoritários presente no OE, como o α -terpineol, timol, γ -terpineno e *p*-cimeno podem reduzir a atividade antibacteriana do mesmo (Martino *et al.*, 2009).

Contrariamente aos resultados de difusão em meio sólido, o cloridrato de tetraciclina apresentou também elevado potencial antimicrobiano, para as estirpes testadas. A tetraciclina é um antimicrobiano de largo espectro que inibe a síntese proteica bacteriana. Atualmente, é reconhecida resistência de diversas estirpes bacterianas patogênicas à tetraciclina. Um dos mecanismos de resistência identificados encontra-se relacionado com a aquisição de inúmeros genes de resistência.

Na tabela 11 encontram-se os valores de CMB obtidos para cada OE face às estirpes bacterianas. Este ensaio apenas foi realizado quando foi detetado potencial bacteriostático do OE.

Tabela 11 Valores de concentração mínima bactericida (CMB) obtidos para os óleos essenciais (OEs) e para o antibiótico padrão (TE-CI) testados, face a estirpes bacterianas patogênicas.

	Valores de CMB							Padrão ($\mu\text{g/mL}$) TE-CI
	Óleos essenciais ($\mu\text{L/mL}$)							
	<i>C. nepeta</i>	<i>L. luisieri</i>	<i>L. pedunculata</i>	<i>L. viridis</i>	<i>M. pulegium</i>	<i>M. spicata</i>	<i>O. vulgare</i>	
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	> 4,0	n.d.	> 3,0	n.d.	> 5,0	> 5,0	> 4,0	7,81
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	> 5,0	1,5	n.d.	n.d.	> 5,0	> 5,0	> 4,0	62,50
<i>S. aureus</i> LFG 1007	1,1	1,0	> 3,0	> 3,0	5,0	4,0	> 4,0	3,91
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	> 5,0	> 2,0	n.d.	n.d.	> 5,0	> 5,0	4,0	250,0
<i>E. coli</i> ATCC 25922	4,3	> 3,0	2,0	> 3,0	4,0	3,0	3,0	125,0
<i>E. coli</i> LFG 1003	> 5,0	> 3,0	n.d.	n.d.	> 5,0	> 5,0	> 4,0	125,0
<i>M. organii</i> LFG 1008	> 5,0	n.d.	> 3,0	> 3,0	> 5,0	> 5,0	> 4,0	62,50
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	> 5,0	n.d.	> 3,0	> 3,0	> 5,0	> 5,0	> 4,0	250,0
<i>P. aeruginosa</i> LFG 1002	1,0	1,0	> 3,0	3,0	> 5,0	> 5,0	> 4,0	125,0
<i>P. mirabilis</i> LFG 1004	> 4,3	3,0	> 3,0	> 3,0	5,0	4,0	> 4,0	125,0
<i>S. enteritidis</i> LFG 1005	> 4,3	n.d.	> 3,0	n.d.	4,0	> 5,0	> 4,0	7,82
<i>S. typhimurium</i> LFG 1006	> 4,3	> 3,0	n.d.	n.d.	5,0	> 5,0	> 4,0	62,50

Legenda: n.d. – não determinado; TE-CI – cloridrato de tetraciclina.

A determinação do valor de CMB permite avaliar qual a concentração mínima que causa a perda total da viabilidade celular da população microbiana. Este ensaio apenas foi realizado quando foi detetado potencial bacteriostático do OE, *i.e.*, nos valores onde anteriormente foi observada inibição do crescimento bacteriano.

Apesar de todos os OEs apresentarem eficácia na inibição do crescimento bacteriano, não foi possível determinar a concentração para a qual se observa o efeito bactericida, tendo-se obtido valores de CMB para algumas das estirpes superiores às concentrações testadas. Assim, é possível concluir que o mecanismo de ação dos OEs face à maioria das estirpes testadas assenta, numa primeira fase, em impedir o crescimento bacteriano das estirpes. Este facto pode ser explicado pela capacidade bacteriana de manter a viabilidade celular após a perda de algum conteúdo celular (Burt, 2004). Contudo, para muitas das estirpes com os diferentes OEs estudados, o mecanismo de ação de antimicrobiana passou por provocar a morte celular, nomeadamente, os OEs de *C. nepeta* face a *S. aureus* LFG 1007, de *L. luisieri* face a *S. aureus* sp., de *L. pedunculata* face a *E. coli* ATCC 25922 e de *L. viridis* face a *P. aeruginosa* LFG 1002. O OE de *L. luisieri* foi o que apresentou maior potencial bactericida face às estirpes microbianas testadas.

O OE de *O. vulgare*, comparativamente com os restantes OEs em estudo, apresentou maior potencial de inibição do crescimento microbiano. No entanto, este OE apresentou o menor potencial bactericida, sugerindo que este OE é um promissor agente bacteriostático, porém apenas exibe atividade bactericida quando aplicado em elevadas concentrações.

5.4. Avaliação do efeito sinérgico das misturas de OEs

A avaliação do efeito sinérgico dos OEs foi realizada em meio líquido, através do método *checkerboard*, com determinação dos valores de CMI e CMB. Este método tem como consequência a determinação de diversos valores de CMI e CMB, em diversas proporções. Os valores tidos em consideração como CMI foram determinados com base no menor valor de índice FIC obtido. Os valores de CMB são relativos ao menor valor obtido nas diversas proporções de OE testadas. Os valores de FIC de cada mistura encontra-se no Anexo I.

Na figura 12 encontram-se representados os valores de CMI resultantes da mistura do OE de *C. nepeta* com os OEs do género *Lavandula*.

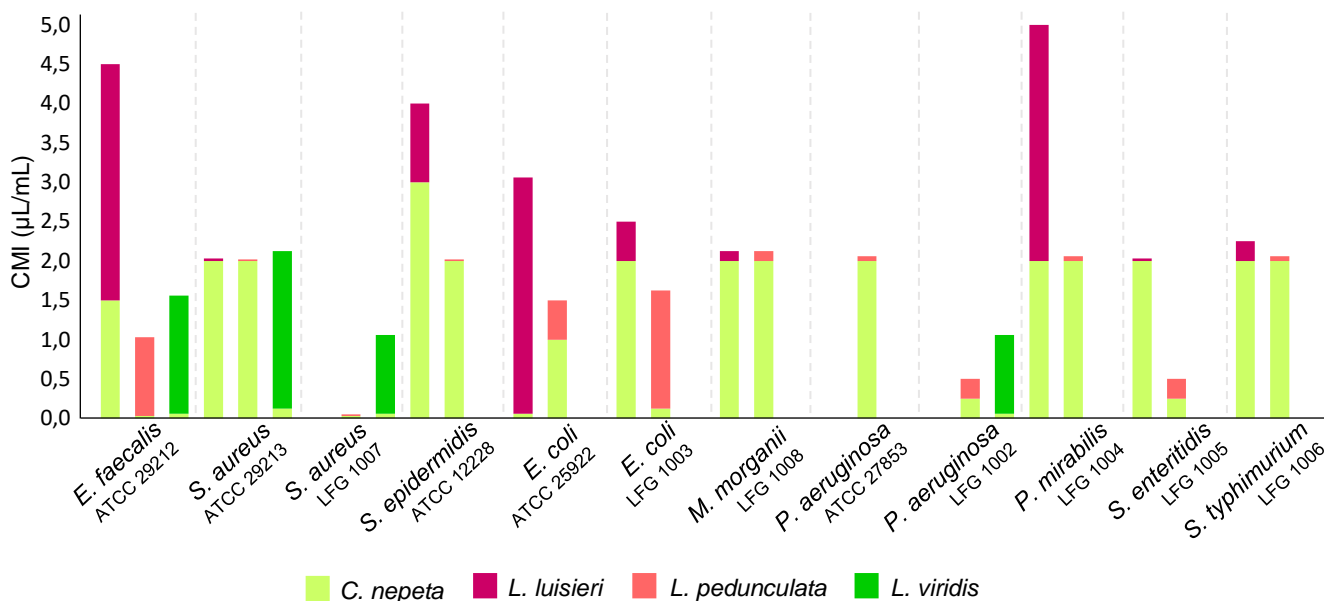


Figura 11 Valores de concentração mínima inibitória (CMI) obtidos para as misturas entre o OE de *C. nepeta* e OEs de género *Lavandula*, face às estirpes microbianas testadas, representados em µL/mL.

A mistura do OE de *C. nepeta* com OEs do género *Lavandula* resultou numa redução da concentração de OE a utilizar para a inibição do crescimento de todas as estirpes microbianas, comparativamente com os resultados obtidos para os OEs em isolado. A este resultado são exceção as estirpes *E. faecalis* ATCC 29212 e *P. mirabilis*, quando estudada a mistura *C. nepeta*/*L. luisieri*. Apesar do valor de FIC da mistura ter sido elevado, face a estas estirpes, não foi detetado efeito antagónico entre os OEs.

Apesar da semelhança da composição química entre o OE de *L. viridis* e o OE de *L. pedunculata*, quando estes se misturam com o OE de *C. nepeta* foram obtidos resultados distintos. Contrariamente aos restantes OEs de *Lavandula* testados, o efeito sinérgico da mistura *C. nepeta*/*L. viridis* ocorre quando é adicionada menor concentração de *C. nepeta*. Nesta mistura foi observado efeito sinérgico face às estirpes *E. faecalis* ATCC 29212, *S. aureus* ATCC 29213 e *P. aeruginosa* LFG 1002.

A mistura entre o OE de *C. nepeta* e o OE de *L. luisieri* foi caracterizada pelas elevadas concentrações de *C. nepeta* e reduzidas concentrações de *L. luisieri*. A interação entre estes OEs pode ocorrer entre os compostos aromáticos e 1,8-cineol (Mulyaningsih *et al.*, 2010). Adicionalmente, quando o OE de *L. luisieri* atingiu

concentrações mais próximas do OE de *C. nepeta*, observou-se um efeito aditivo. Estes resultados sugerem que a interação sinérgica entre os OEs ocorre com reduzidas concentrações de *L. luisieri*. Ao comparar a composição química dos dois OEs, a maior diferença assenta na concentração de pulegona no OE de *C. nepeta* e a presença de compostos derivados de necronado presente no OE de *L. luisieri*. Assim, é expectável os compostos de necronado interajam com a pulegona, aumentando o potencial antimicrobiano de ambos os OEs.

A mistura do OE de *C. nepeta* com o OE de *L. pedunculata* foi a mistura mais eficaz, comparativamente a este conjunto de misturas, tendo sido obtidos os menores valores de FIC. Adicionalmente, esta mistura apresentou efeito sinérgico face a todas as estirpes testadas, exceto a *E. coli* ATCC 25922.

O efeito sinérgico apresentado para a esta mistura foi total, exceto face à estirpe *P. aeruginosa* LFG 1002 onde o efeito sinérgico foi parcial com um valor de índice FIC de 0,58 (tabela 14, Anexo I). De modo semelhante à mistura de *C. nepeta*/*L. luisieri*, esta mistura apresentou melhores resultados quando utilizada maior concentração de OE de *C. nepeta*.

Na figura 13 apresentam-se os valores de CMI da mistura do OE de *C. nepeta* com OEs de género *Mentha*.

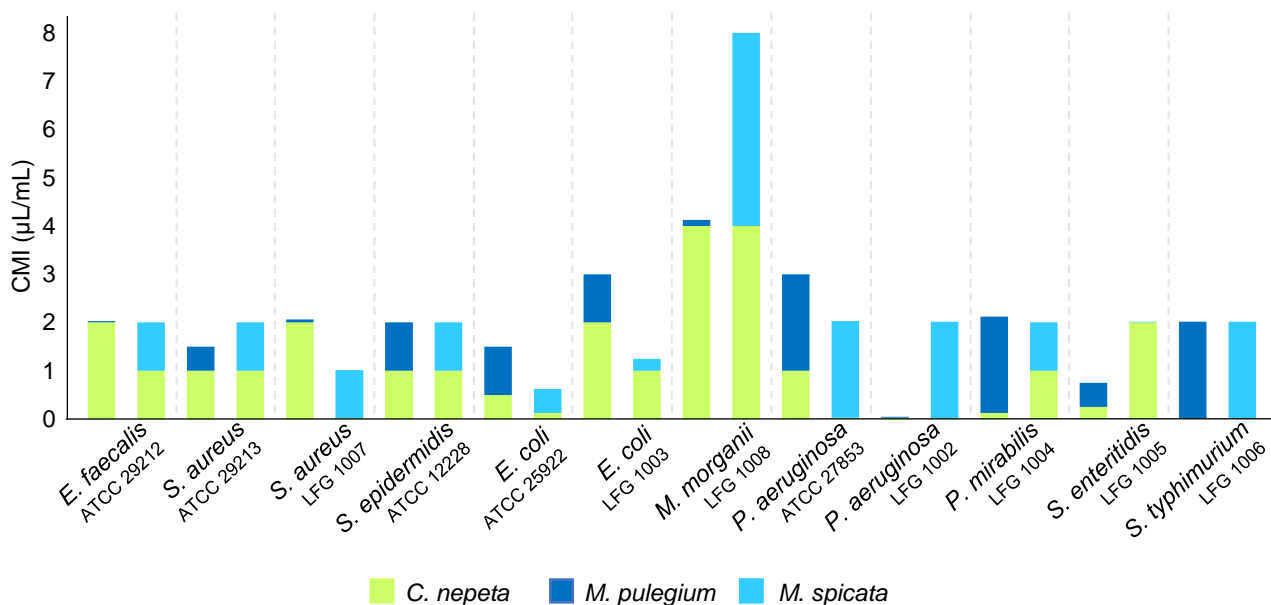


Figura 12 Valores de concentração mínima inibitória (CMI) obtidos para as misturas entre o OE de *C. nepeta* e OEs de género *Mentha*, face às estirpes microbianas testadas, representados em µL/mL.

A mistura de OE de *C. nepeta* com os OEs do género *Mentha* apresentou elevado potencial antimicrobiano para todas as estirpes microbianas em estudo, tendo sido obtidos valores de CMI iguais ou inferiores a 2,0 µL/mL para a maioria das misturas.

Esta mistura foi a que obteve melhores resultados, tendo sido observado efeito sinérgico para todas as estirpes exceto a de *M. morganii*. Não foram observadas diferenças significativas nos valores de CMI obtidos para a maioria das estirpes bacterianas. As estirpes de *E. coli* e *S. aureus* LFG 1007 foram as mais suscetíveis a esta mistura.

Adicionalmente, apenas foram detetadas três estirpes para as quais os OEs estabeleceram efeito aditivo, tendo sido observado efeito sinérgico nos restantes ensaios (tabela 15, Anexo I). Ambas as misturas apresentaram maior eficácia face às estirpes gram-positivas, estabelecendo um efeito sinérgico total entre si, à exceção da mistura *C. nepeta*/*M. spicata* face à estirpe *S. aureus* ATCC 29213.

Na mistura *C. nepeta* e de *M. pulegium* é de salientar a suscetibilidade da estirpe *P. aeruginosa* LFG 1002, com valor de CMI de 0,05 µL/mL. De modo geral, nesta mistura foram obtidos valores de CMI com maior concentração de *C. nepeta* face a estirpes gram-positivas e com maior concentração em *M. pulegium* face a estirpes gram-negativas. Assim, é possível verificar que o aumento da complexidade da estrutura da membrana celular implica a necessidade de maior concentração de *M. pulegium*. Considerando que ambos os OEs apresentam pulegona como componente maioritário da sua constituição, e que este composto foi anteriormente descrito como principal responsável da atividade antibacteriana dos OEs, a ação deste componente maioritário neste ensaio resultaria num efeito aditivo, onde o mecanismo de ação dos dois OEs seria semelhante. Deste modo, os resultados do presente estudo sugerem a ocorrência de um efeito sinérgico entre os seus componentes minoritários.

Na figura 14 apresentam-se os valores de CMI da mistura do OE de *C. nepeta* com o OE de *O. vulgare*.

A mistura dos OEs de *C. nepeta* e de *O. vulgare* apresentou potencial antimicrobiano mais eficaz face a estirpes gram-positivas, com valores de CMI compreendidos entre 1,03 e 2,03 µL/mL. Nesta mistura, quando foi observado efeito sinérgico este foi total, exceto face à estirpe *P. aeruginosa* ATCC 27853.

As estirpes para as quais foi obtido efeito aditivo são pertencentes a coleção de ensaio clínico. Adicionalmente, os valores mais baixos de FIC foram obtidos para estirpes de coleção ATCC, à exceção das estirpes de género *Salmonella* (tabela 16,

Anexo I). Estes resultados sugerem a potencial capacidade de adaptação e consequente de resistência das estirpes de isolado clínico. Estes resultados foram acentuados nas estirpes de *E. coli* e *P. aeruginosa*.

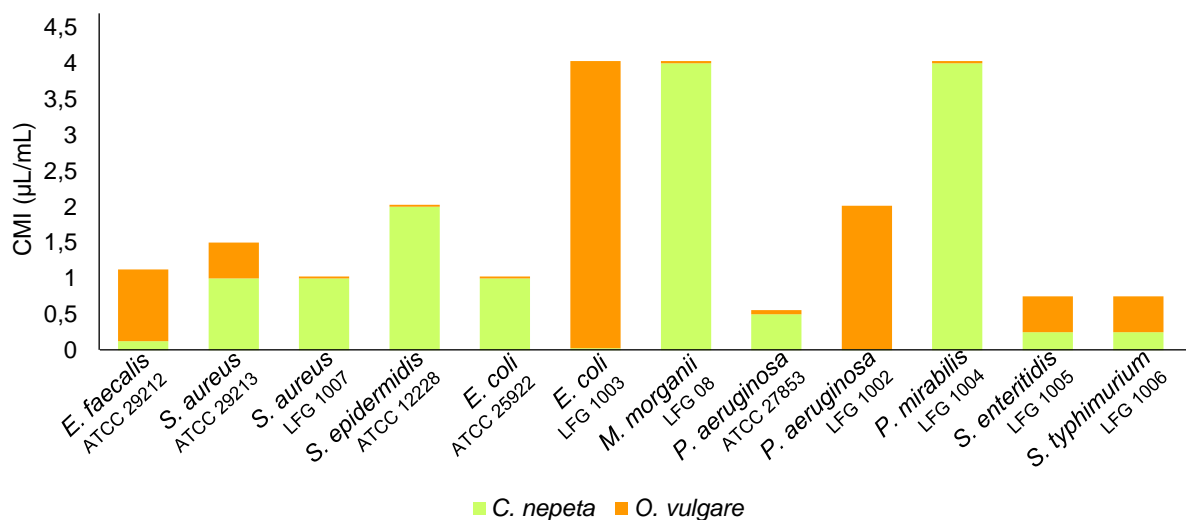


Figura 13 Valores de concentração mínima inibitória (CMI) obtidos para as misturas entre o OE de *C. nepeta* e o OE de *O. vulgare*, face às estirpes microbianas testadas, representados em µL/mL.

De salientar que, nestas estirpes, o valor de CMI da mistura para as estirpes de ensaio clínico foi constituído maioritariamente por *O. vulgare*. Adicionalmente, o valor de CMI de cada OE em isolado é inferior ao obtido na mistura, face a ambas as estirpes. Assim, apesar de não ser observado efeito antagónico, também não é totalmente observada a adição das propriedades de ambos os OEs. Consequentemente, é possível concluir que os OEs possivelmente não estabelecem interação entre si face a estirpes de isolados clínicos de *E. coli* e *P. aeruginosa*. Existe também a hipótese de os OEs estabelecerem um efeito sinérgico entre si que confere à mistura novas propriedades antimicrobianas, perante as quais estas estirpes bacterianas têm facilidade em adquirir resistência.

Na figura 15 apresentam-se os valores de CMI da mistura de dois OEs de género *Lavandula* entre si, nomeadamente, OE de *L. pedunculata* e OE de *L. viridis*.

A mistura *L. pedunculata*/*L. viridis* apresentou maior potencial antibacteriano face a bactérias gram-positivas, revelando efeito sinérgico face estas estirpes (tabela 17, Anexo I). Nas estirpes gram-negativas, o efeito aditivo ocorreu quando o CMI se obteve com maior concentração de *L. viridis* do que *L. pedunculata*.

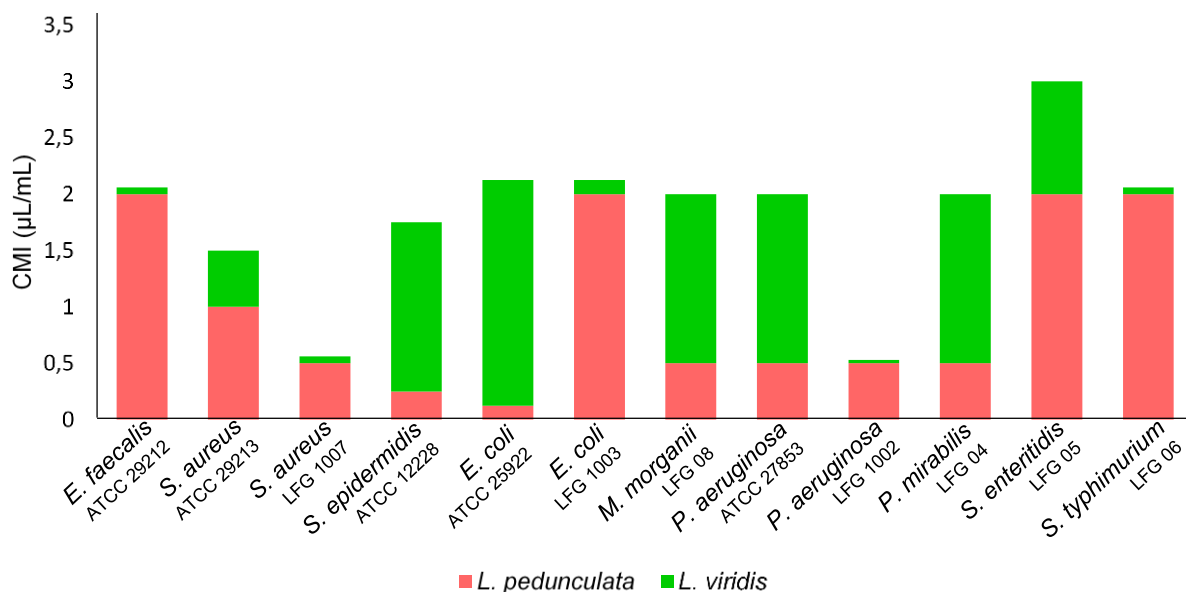


Figura 14 Valores de concentração mínima inibitória (CMI) obtidos para as misturas entre o OE de *L. pedunculata* e o OE de *L. viridis*, face às estirpes microbianas testadas, representados em µL/mL.

A composição química dos dois OEs misturados apresenta várias semelhanças nos seus compostos maioritários, sendo diferenciada pela composição em fenchona do OE de *L. viridis*. Assim, o efeito aditivo observado na mistura pode estar relacionado com a composição em 1,8-cineol e cânfora, os quais, como descrito anteriormente, são compostos com atividade antimicrobiana. A fenchona é um composto químico com atividade antimicrobiana reduzida (Bouzouita *et al.*, 2005). Assim, é possível formular duas hipóteses sobre o efeito sinérgico desta mistura, nomeadamente, a fenchona em sinergia com compostos minoritários do OE de *L. pedunculata* adquire propriedades antimicrobianas ou o efeito sinérgico observado para a mistura é totalmente atribuído aos compostos minoritários de ambos os OEs.

Na figura 16 são apresentados os valores de CMI relativos às misturas de OEs do género *Lavandula* com OEs do género *Mentha*.

Os valores de CMI obtidos nesta mistura foram variáveis entre as diversas estirpes, não sendo possível estabelecer diferenças consideráveis na eficácia da mistura entre estirpes gram-positivas e gram-negativas. As estirpes mais suscetíveis a esta mistura foram as de *P. aeruginosa* e *S. aureus* LFG 1007, com efeito sinérgico total e valores de CMI entre 0,56 e 0,05 µL/mL.

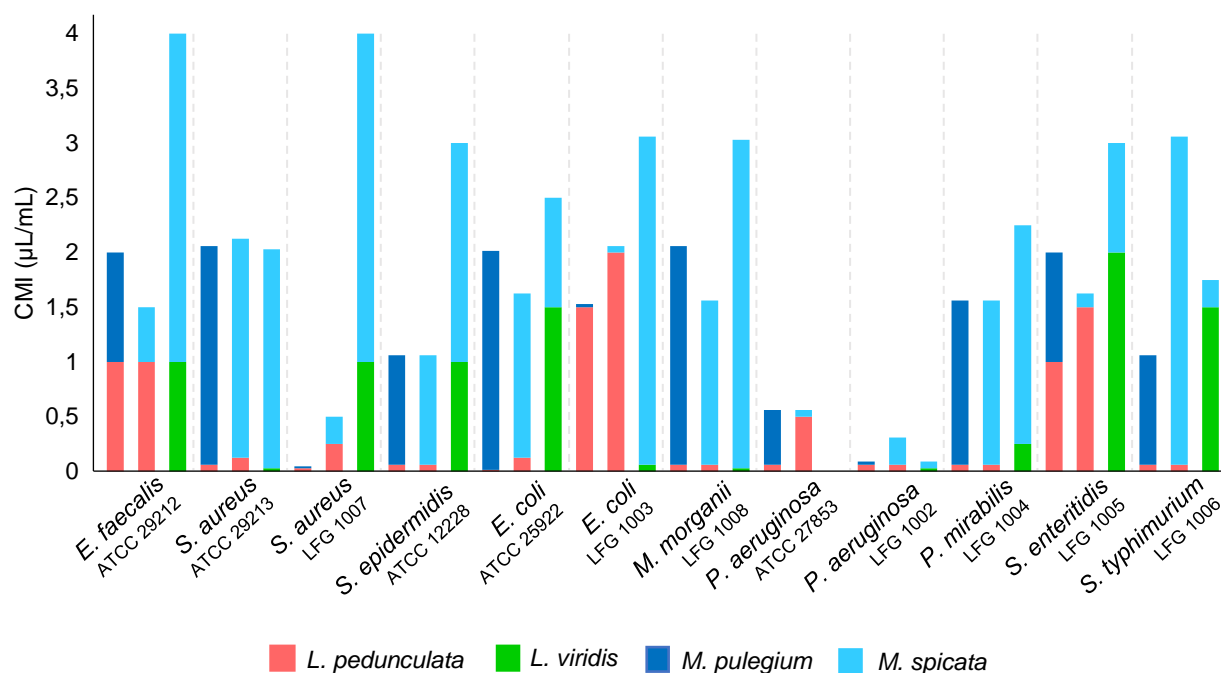


Figura 15 Valores de concentração mínima inibitória (CMI) obtidos para as misturas entre os OEs de género *Lavandula* e os OEs de género *Mentha*, face às estirpes microbianas testadas, representados em µL/mL.

A mistura de *L. pedunculata*/*M. pulegium* apresentou efeito sinérgico face a todos os microrganismos testados, exceto a estirpe *E. coli* ATCC 25922 para a qual estabeleceu efeito aditivo (tabela 18, Anexo I). O efeito sinérgico desta mistura pode estar associado aos componentes maioritários dos OEs, nomeadamente, 1,8-cineol, cânfora e pulegona. O 1,8-cineol reduz a tolerância da célula a sais, aumentando a sua permeabilidade (Carson *et al.*, 2002). Adicionalmente, a cânfora destabiliza a bomba protónica da célula (Bouazama *et al.*, 2017). Assim, a célula pode aumentar a sua sensibilidade a outros agentes antimicrobianos, como a pulegona.

A mistura de *L. pedunculata*/*M. spicata* apresentou efeito sinérgico face a todas as estirpes microbianas testadas. Adicionalmente, a mistura apresentou efeito sinérgico total face à maioria das estirpes. A carvona é um composto com propriedades antimicrobianas reconhecidas, no entanto, com pouca interação com a membrana celular (Helander & Alakomi, 1998). Assim, o dano causado na membrana pelos compostos presentes no OE de *L. pedunculata* podem facilitar a sua entrada na célula e, conseqüentemente, potenciar o seu potencial antibacteriano.

A mistura de *L. viridis*/*M. spicata* apresentou efeito aditivo face à maioria dos OEs. Apesar de o OE de *L. viridis* apresentar uma composição química com componentes maioritários coincidentes com os de *L. pedunculata*, os dois OEs

originaram interações distintas quando misturados com a *M. spicata*. Assim, é possível concluir que o efeito sinérgico entre os OEs ocorre com os compostos minoritários dos OEs de género *Lavandula*.

Na figura 17 são apresentados os valores de CMI relativos às misturas de OEs do género *Mentha*.

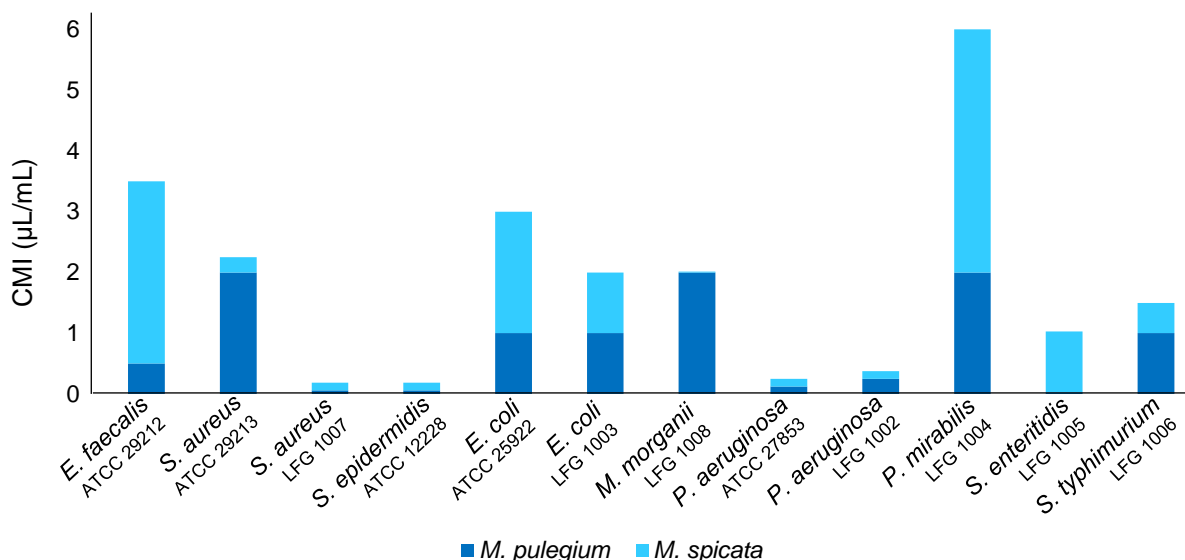


Figura 16 Valores de concentração mínima inibitória (CMI) obtidos para as misturas entre os OEs de género *Mentha*, face às estirpes microbianas testadas, representados em µL/mL.

As estirpes *S. aureus* LFG 1007 e *S. epidermidis* ATCC 12228 apresentaram maior sensibilidade à mistura, com valores de CMI de 0,19 µL/mL. O fenol carvacrol, presente na composição química de ambos os OEs, é um composto com elevado potencial antimicrobiano (De Azeredo *et al.*, 2011). Assim, o aumento da concentração de carvacrol resultante da mistura pode estar relacionado com o aumento da eficácia dos OEs, comparativamente com os resultados obtidos quando estes foram estudados em isolado.

A mistura *M. pulegium*/*M. spicata* revelou elevado potencial bacteriostático, tendo sido obtido efeito aditivo entre os OEs apenas para quatro estirpes bacterianas. Quando foi verificado efeito sinérgico, observou-se que este era total, com valores de FIC inferiores a 0,46 (tabela 19, Anexo I).

Alguns autores que utilizam a classificação da interação dos OEs de $FIC \leq 0,75$ como efeito sinérgico também descrevem que valores de FIC acima de 2,0 representam efeito antagónico (Gallucci *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2018). A estirpe

P. mirabilis como valor de CMI com FIC mais baixo 6,0 µL/mL. Esta concentração é o dobro da concentração de cada OE em isolado face à mesma estirpe bacteriana. Assim, é possível ponderar a ocorrência de efeito antagônico entre os OEs face a esta estirpe. Contudo, a hipótese de efeito aditivo não é totalmente afastada, devido a ter sido necessária menos concentração do OE de *M. pulegium* em mistura, comparativamente com os resultados do OE em isolado. De modo a confirmar a interação dos OEs face a esta estirpe microbiana seria necessário a realização de ensaios mais específicos para a avaliação da viabilidade celular, tais como, microscopia de varrimento eletrônico.

A interação entre os OEs é determinada recorrendo ao valor de FIC da mistura. Assim, em termos comparativos, a eficácia da mistura é observada através da totalidade dos valores FIC obtidos. Na figura 18 encontram-se os valores de FIC obtidos para todas as misturas. As misturais mais promissoras foram as de *C. nepeta/L. pedunculata*, *C. nepeta/M. spicata* e *L. pedunculata/M. pulegium*, as quais apenas não apresentaram efeito sinérgico face a uma estirpe bacteriana. Adicionalmente, mistura *C. nepeta/M. spicata* apresentou efeito sinérgico total face à maioria das estirpes bacterianas.

O efeito sinérgico total e parcial foram não só distinguidos pelos valores FIC mas também pela diferença de resultados de CMI. O efeito sinérgico total foi caracterizado pela diminuição significativa do valor de CMI de ambos os OEs em mistura, comparativamente com o valor de CMI em isolado. Por outro lado, o efeito sinérgico parcial foi observado quando um OE diminuía drasticamente o valor de FIC e o restante OE registava uma diminuição do valor de CMI pouco assentuada.

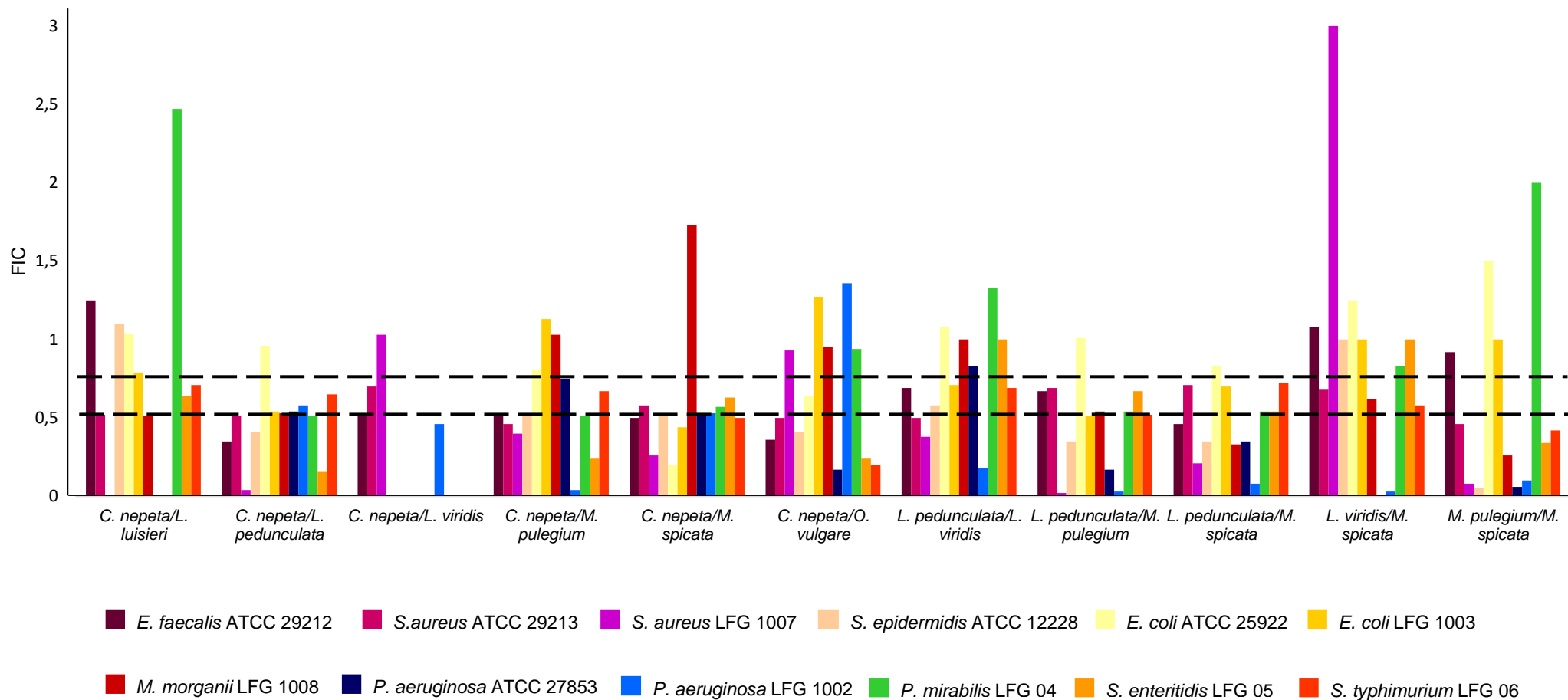


Figura 17 Valores de índice de concentração inibitória fracionada (FIC) obtidos nas diversas misturas de óleos essenciais (OEs) face às estirpes bacterianas.

5.5. Avaliação do potencial bactericida das misturas

No Anexo II encontram-se os valores de CMB obtidos para as misturas estudadas. Apesar do elevado potencial bacteriostático, a maioria das misturas apresentaram potencial bactericida reduzido. De modo geral, os valores de CMI não foram coincidentes com os valores de CMB. Estes resultados sugerem que o mecanismo de ação das misturas é maioritariamente bacteriostático.

As misturas dos OEs *M. pulegium* e *M. spicata* apresentou o maior potencial bactericida, comparativamente à totalidade das misturas testadas. Contudo, as misturas apresentam mecanismo de ação bactericida em concentrações mais elevadas. Adicionalmente, não foi possível determinar os valores de CMB para ambos os OEs isolados face à maioria das estirpes bacterianas testadas. Ao comparar estes resultados é possível confirmar a ocorrência de interações entre os dois OEs de género *Mentha* em estudo.

A mistura do OE de *C. nepeta* com os OEs de *Mentha* revelou elevado potencial bactericida face à maioria das estirpes testadas. Em todas as estirpes onde foi possível determinar o valor de CMB foi verificado um aumento da concentração relativamente ao valor de CMI, o que sugere que o mecanismo de ação da mistura é primeiramente bacteriostático e apenas em concentrações mais elevadas causa a morte celular.

Na mistura *C. nepeta/M.pulegium* foi necessário testar misturas com maior concentração de *M. pulegium* para obter efeito bactericida. Estes resultados sugerem que o potencial bactericida da mistura é atribuído a um composto presente no *M. pulegium* que pode ser potenciado por efeito sinérgico com o OE de *C. nepeta*.

5.6. Avaliação da viabilidade celular por citometria de fluxo

Os ensaios de avaliação da viabilidade foram realizados com vista à confirmação do efeito sinérgico, através de citometria de fluxo e confirmados por microscopia de epifluorescência. A avaliação da viabilidade celular foi realizada através da reação dos reagentes Anexina V e PI com as células. Para o efeito, foi selecionada a mistura *C. nepeta/L. pedunculata* devido aos valores de CMI reduzidos obtidos face à totalidade

das estirpes bacterianas testadas. Foram selecionadas estirpes bacterianas com propriedades físicas distintas, e.g. composição da membrana e tamanho celular.

Inicialmente, foi realizado um *screening* de populações contaminantes no ensaio, as quais foram sinalizadas e separadas dos resultados através do programa de *software*. O controlo positivo de cada amostra foi obtido pela análise do tamanho celular, em simultâneo com a separação das bactérias da amostra e das células contaminantes. No Anexo III apresentam-se os resultados relativos ao controlo positivo de todas as estirpes bacterianas testadas.

Em todas as amostras de controlo positivo foi possível definir um padrão de tamanho celular da população. O controlo positivo de *E. faecalis* é constituído por dois tipos de população bacteriana, de acordo com o tamanho celular. Este resultado é atribuído ao facto de os OEs volatilizarem durante o tempo de incubação, podendo induzir algumas alterações das células. Este fenómeno foi também observado no controlo positivo de *E. coli* LFG 1003, onde apenas foram detetadas cerca de 774 células, *i.e.*, a volatilização da mistura de OEs causou a perda de células viáveis.

Foi considerado que as células viáveis não apresentam dano na membrana. Como a PS encontra-se dentro das células e estas não são permeáveis aos reagentes utilizados, as células viáveis são negativas para a Anexina V e PI (3º quadrante). No início da apoptose ocorre alguma exposição da PS, no entanto as células continuam impermeáveis. Assim, as células em início de apoptose são positivas para a Anexina V e negativas para o PI (4º quadrante). Nas células em apoptose e em morte celular ocorre a exposição da PS e permeabilização da membrana, originando num resultado positivo para a Anexina V e PI (1º quadrante). Devido a o PI apenas corar células permeáveis, na microscopia de epifluorescência apenas foi possível observar fluorescência em células apoptóticas ou mortas (Engeland *et al.*, 1998). Quando as células se encontram no 2º quadrante, estas são positivas para o PI e negativas para a Anexina V. Consequentemente, as células apresentam membrana permeável, contudo não ocorre exposição de PS. Assim, não é possível retirar conclusões imediatas sobre a sua viabilidade.

Os resultados relativos aos ensaios de viabilidade celular através de citometria de fluxo assim como por microscopia de epifluorescência encontram-se no Anexo III. Na figura 19 encontram-se os resultados obtidos por citometria de fluxo assim como por microscopia de epifluorescência obtidos nas concentrações mais baixas testadas.

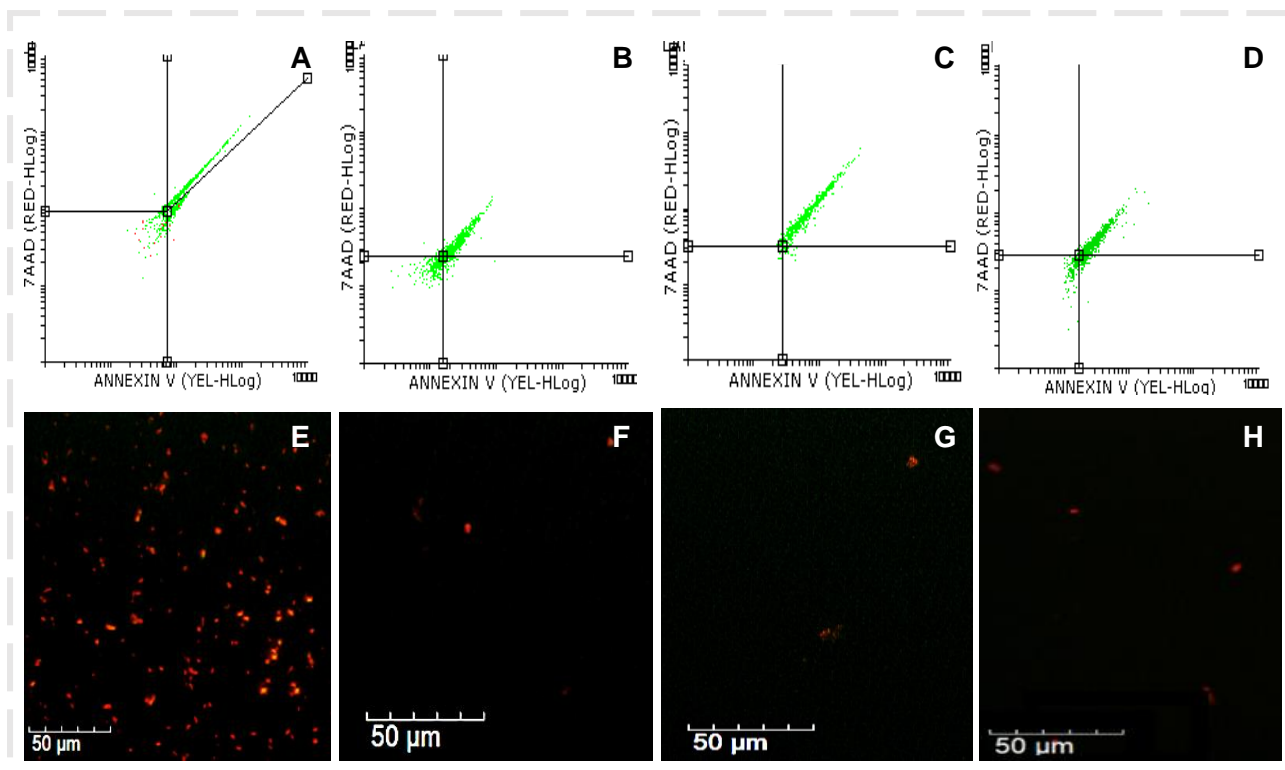


Figura 18 Resultados relativos à concentração de mistura mais baixa testada, obtidos por citometria de fluxo e microscopia de epifluorescência. A – gráfico de dispersão resultante de citometria relativo a *E. faecalis* ATCC 29212; B - gráfico de dispersão resultante de citometria relativo a *S. aureus* LFG 1007; C - gráfico de dispersão resultante de citometria relativo a *E. coli* LFG 1003; D – gráfico de dispersão resultante de citometria relativo a *P. aeruginosa* LFG 1002; E – microscopia de epifluorescência de *E. faecalis* ATCC 29212; F – microscopia de epifluorescência de *S. aureus* LFG 1007; G – microscopia de epifluorescência de *E. coli* LFG 1003; H – microscopia de epifluorescência de *P. aeruginosa* LFG 1002.

De modo geral, a concentração de mistura 6,0 µL/mL resultou na detecção de números reduzidos de células. Estes resultados indicam que a mistura de OEs induziu a lise celular nos microrganismos, sendo obtidos fragmentos celulares, os quais não foram possíveis de detetar. Adicionalmente, em microscopia de epifluorescência onde foi observada a presença de um número de células reduzido e com elevada intensidade de fluorescência, a qual está associada a fenómenos de condensação da cromatina (Pietkiewicz *et al.*, 2015). No ensaio de *checkerboard* esta concentração é igual ou superior ao valor de CMB das estirpes bacterianas *E. faecalis*, *E. coli* LFG 1003 e *P. aeruginosa* LFG 1002. Assim, é confirmado que a indução da morte celular, provocada pela mistura, ocorre através da indução da lise celular.

Nas concentrações imediatamente inferiores à concentração 6 µL/mL foi possível observar o aumento do tamanho celular na maioria das células. Estes resultados sugerem que um dos mecanismos associados ao potencial bacteriostático da mistura é a indução do aumento do tamanho celular, o qual pode resultar do aumento da permeabilidade da membrana. É expectável que a lise celular ocorra em

consequência do aumento do volume celular. Contudo, durante a apoptose as células o seu tamanho (Dockrell, 2001). Assim, este resultado pode também sugerir que esta mistura, quando bactericida, causa a morte celular através de mecanismos de necrose.

Quando a estirpe *E. faecalis* ATCC 29212 foi tratada com a mistura foi possível observar o efeito sinérgico entre os OEs. Contudo, a perda de eficácia da mistura de OEs devido ao aumento da concentração sugere a existência de algum efeito antagónico entre os seus componentes. Em ensaio de *checkerboard*, esta concentração apresentou 89% de inibição do crescimento microbiano através de turbidimetria e 82% de segundo a atividade das enzimas desidrogenases. Contudo, estes resultados não foram observados no equipamento estereoscópico. Deste modo, é ponderada a hipótese de ter sido observado um precipitado de células mortas no equipamento estereoscópico.

Todos os ensaios foram realizados em microplaca e em tubo, não tendo sido detetadas diferenças entre os ensaios, à exceção do controlo positivo de *E. coli* LFG 1003. Nesta estirpe bacteriana o controlo positivo realizado em tubo apresenta a morfologia das células de *E. coli*. Contrariamente, o controlo positivo realizado em microplaca apresenta células com uma morfologia diferente. A diferença de resultados obtida para os controlos está relacionada com a volatilização dos OEs na microplaca, os quais podem criar uma atmosfera com uma concentração reduzida de OE. Face a esta atmosfera, as células de *E. coli* LFG 1003 adotaram mecanismos de resistência relacionados com a sua morfologia. Horvath *et al.* (2011) descrevem a plasticidade morfológica de *E. coli* como um dos mecanismos de resistência a fagócitos. De modo concordante com os resultados obtidos, os autores relatam a adoção de uma morfologia filamentosa.

Nas células de *P. aeruginosa* LFG foi também observado um mecanismo de resistência aos OEs, no qual a célula diminuiu o seu tamanho celular. Adicionalmente, as células viáveis apresentam um perfil onde é verificado o aumento da impermeabilidade da membrana ao PI, o que não foi observado nos restantes ensaios.

De modo semelhante às células de *E. coli*, o mecanismo de resistência por plasticidade morfológica é também descrito em estirpes de *P. aeruginosa*. Nesta estirpe bacteriana, a alteração da morfologia da célula ocorre na sequência da formação de biofilmes bacterianos. Este fenómeno resulta na alteração na membrana citoplasmática e diminuição da hidrofobicidade de células de *P. aeruginosa* (Flores-Mireles *et al.*, 2015; Yu *et al.*, 2014).

5.7. Avaliação da letalidade em *Artemia salina*

A determinação do valor de CL_{50} foi realizada com base nas curvas dose-resposta obtidas nos ensaios de letalidade em *Artemia salina*, apresentadas na figura 20. Os valores de CL_{50} obtidos para cada OE e para o controlo positivo (dicromato de potássio) apresentam-se no Anexo IV.

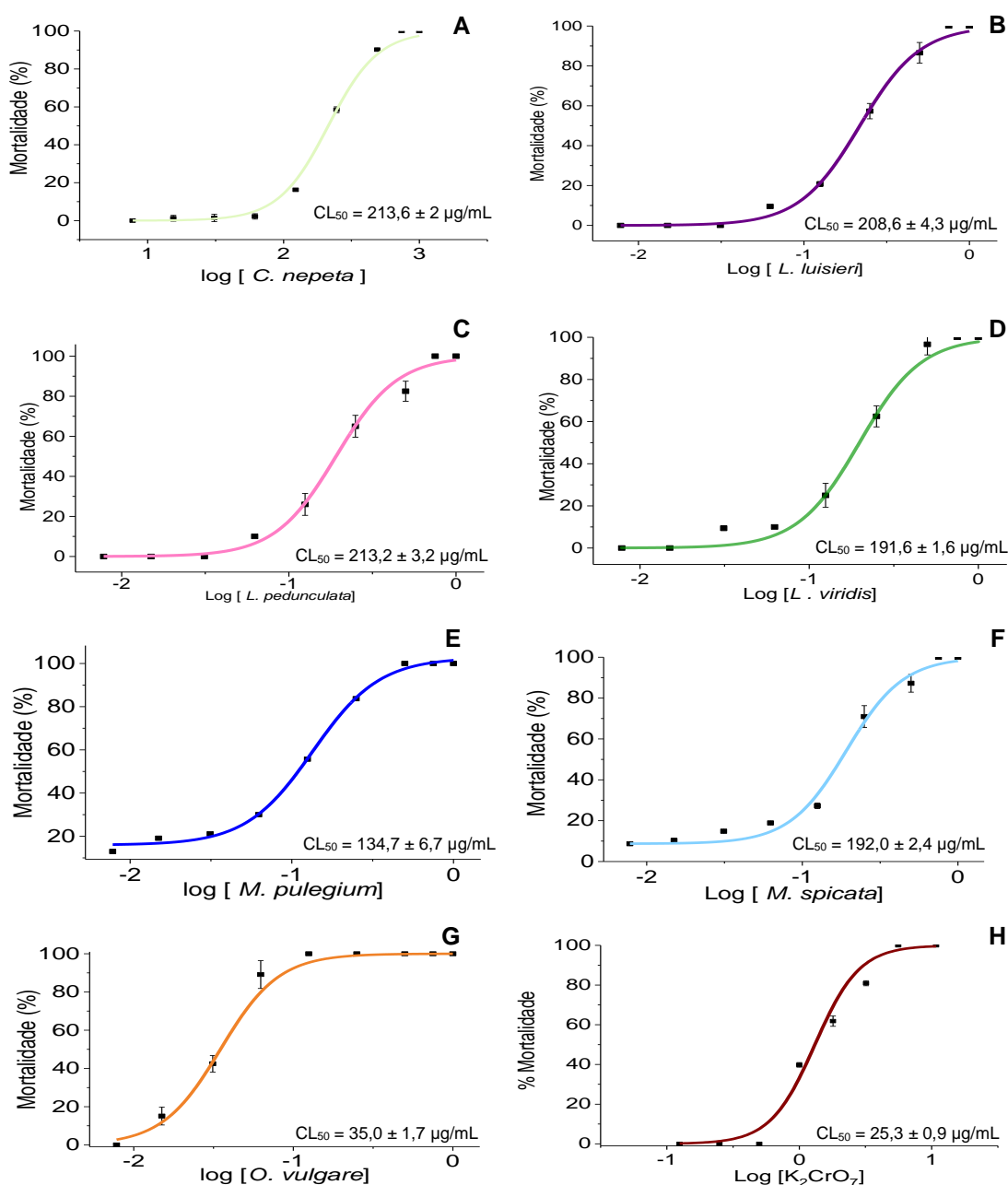


Figura 19 Curvas dose-resposta obtidas nos ensaios de letalidade em *Artemia salina*. A – OE de *C. nepeta*; B – OE de *L. luisieri*; C – OE de *L. pedunculata*; D – OE de *L. viridis*; E – OE de *M. pulegium*; F – OE de *M. spicata*; G – OE de *O. vulgare*; H – Dicromato de potássio (K_2CrO_7).

Os estudos de letalidade em *Artemia salina* são considerados procedimentos úteis para a realização de um *screening* da toxicidade de compostos bioativos de plantas e estabelecem uma correlação positiva com a dose letal em ratinhos (Carballo *et al.*, 2002; Déciga-Campos *et al.*, 2007). Adicionalmente, estudos demonstraram que esta metodologia pode também inferir sobre a genotoxicidade e citotoxicidade dos compostos (Parra *et al.*, 2001).

Os OEs em estudo apresentaram elevada letalidade face a *A. salina*, apresentando valores compreendidos entre 35,0 e 213,6 µg/mL. De acordo com o índice de toxicidade de Clarkson, valores de CL₅₀ superiores a 1000 µg/mL são considerados não tóxicos, valores de CL₅₀ entre 500 e 1000 µg/mL são indicadores de toxicidade moderada e valores inferiores a 100 µg/mL indicam toxicidade. Assim, é considerado que os OEs com valores de CL₅₀ inferiores a 500 µg/mL apresentam toxicidade (Bastos *et al.*, 2009; Hamidi *et al.*, 2014).

De modo geral, os OEs apresentaram valores de CL₅₀ indicadores de toxicidade moderada face a *A. salina*. Contudo, estes apresentaram toxicidade inferior ao controlo positivo em estudo, dicromato de potássio.

5.8. Avaliação da toxicidade “*in vivo*”

Os valores de DL₅₀ dos OEs, determinados segundo as normas OECD (2001), apresentam-se na tabela 13. Globalmente, os OEs em estudo apresentaram toxicidade reduzida em ratinhos *Swiss*. Durante o *screening* farmacológico de toxicidade aguda não foram observados sinais clínicos de toxicidade.

Comparativamente com os restantes OEs estudados, o OE de *M. pulegium* apresentou maior toxicidade com valor de DL₅₀ de 550 mg/kg. A toxicidade deste OE encontra-se fortemente relacionada com a sua elevada concentração em pulegona (Božović & Ragno, 2017).

Tabela 13 Valores de DL₅₀ relativos aos óleos essenciais em estudo obtidos em ensaios em ratinhos *Swiss*.

Óleos essenciais/Padrão	DL ₅₀ (mg/kg)
<i>C. nepeta</i>	n.d.
<i>L. luisieri</i>	> 2000
<i>L. pedunculata</i>	2000
<i>L. viridis</i>	> 2000
<i>M. pulegium</i>	550
<i>M. spicata</i>	> 500
<i>O. vulgare</i>	2000

Legenda: n.d. – não determinado.

Os OEs de *L. luisieri*, *L. pedunculata*, *L. viridis* e *O. vulgare* apresentaram toxicidade reduzida com valores de DL₅₀ iguais ou superiores a 2 000 mg/kg. Os OEs de género *Lavandula* são reconhecidos pela sua baixa toxicidade. No entanto, os seus potenciais efeitos tóxicos podem encontrar-se relacionados com a sua constituição em D-limoneno, geraniol, linalol e acetato de linalilo. No entanto, alguns estudos demonstraram que o linalol, após ingerido, é rapidamente conjugado, excluindo o risco de toxicidade crónica (Chu & Kemper, 2005).

6. Conclusões e perspectivas futuras

Os óleos essenciais em estudo apresentaram uma composição química diversificada, sendo semelhante a elevada concentração em monoterpenos oxigenados. O OE de *C. nepeta* apresentou como componentes maioritários isopulegona (33,12%), pulegona (21,72%), mentona (12,91%) e 1,8-cineol (9,35%). O óleo essencial de *L. luisieri* apresentou elevada composição em compostos derivados de necrodano, nomeadamente, acetato de α -necrodilo (20,49%) e α -necrodol (8,38%). Este OE apresentou também como componentes maioritários 4-terpineol (15,88%), 1,8-cineol (10,94%), β -cariofileno (5,78%) e isoborneol (5,73%). Os componentes maioritários do óleo essencial de *L. pedunculata* foram fenchona (44,05%), cânfora (20,90%), α -pineno (5,52%) e limoneno (5,25%). O OE de *L. viridis* apresentou como componentes maioritários 1,8-cineol (49,17%), a cânfora (12,36 %) e linalol (7,23 %). O OE de *M. pulegium* apresentou apenas dois compostos maioritários, nomeadamente, pulegona (79,71%) e isomentona (4,90%). Os compostos maioritários obtidos no OE de *M. spicata* foram carvona (56,61%), 1,8-cineol (12,14%), mirceno (7,41%) e 4-terpineol (7,17%). O OE de *O. vulgare* apresentou como compostos maioritários γ -terpineno (21,6%), timol (20,8%), metil-timol (17,7%) e M-cimeno (13,0%).

De modo geral, os OEs em estudo revelaram um largo espectro de ação antimicrobiana, com capacidade inibitória do crescimento bacteriano de estirpes gram-positivas e gram-negativas. O *screening* do potencial antibacteriano dos OEs foi realizado através de ensaios em meio sólido. Nesta metodologia, o OE de *O. vulgare* apresentou maior eficácia, tendo sido verificada inibição total do crescimento das estirpes testadas. Os OEs de *C. nepeta*, *L. pedunculata*, *L. viridis* e *M. spicata* apresentaram maior eficácia face a estirpes gram-positivas. Este facto por estar associado à diferença na composição da membrana celular entre estirpes gram-positivas e gram-negativas.

Nos métodos de determinação da atividade antimicrobiana por microdiluição foi possível determinar os valores de CMI para a maioria dos OEs face às estirpes bacterianas em estudo, comprovando o seu potencial bacteriostático nas concentrações testadas. O OE de *C. nepeta* foi o que apresentou maior eficácia face a estirpes gram-negativas com valores de CMI compreendidos entre 0,5 e 4,0 μ L/mL. Os OEs de género *Lavandula* apresentaram resultados muito diversificados, evidenciando a importância da concentração dos compostos químicos aos quais é atribuído o potencial antimicrobiano. O OE de *L. luisieri* foi distinguido dos restantes OEs de género *Lavandula* pela sua

eficácia face a estirpes gram-positivas. Contrariamente, os OEs de *L. pedunculata* e *L. viridis* apresentaram maior potencial inibitório do crescimento de estirpes gram-negativas. Os OEs de género *Mentha* apresentaram os valores de CMI mais elevados, compreendidos entre 2,0 e 5,0 µL/mL..

O OE de *O. vulgare* apresentou maior eficácia na inibição do crescimento bacteriano para todas as estirpes testadas, com valores de CMI compreendidos entre 1,5 e 3,0 µL/mL. O potencial antimicrobiano deste OE encontra-se diretamente relacionado com a sua constituição em compostos fenólicos.

A maioria dos OEs não apresentaram potencial bactericida nas concentrações testadas. Deste modo, é possível concluir que o modo de ação dos OEs assenta em mecanismos maioritariamente bacteriostáticos. No entanto, nalguns casos foi possível observar que o mecanismo de ação de antimicrobiana do OE foi totalmente bactericida. O OE de *L. luisieri* foi o que apresentou maior potencial bactericida face às estirpes microbianas testadas.

As misturas de dois OEs foram permitiram obter diminuições consideráveis dos valores de CMI. As misturais mais promissoras foram as de *C. nepeta/L. pedunculata*, *C. nepeta/M. spicata* e *L. pedunculata/M. pulegium*, as quais apenas não apresentaram efeito sinérgico face a uma estirpe bacteriana. Adicionalmente, a mistura *C. nepeta/L. pedunculata* apresentou maior potencial bactericida, sendo destacados os resultados obtidos face às estirpes *E. coli* ATCC 25922 e *S. enteritidis*, com valores de CMB de 2,03 e 2,125 µL/mL, respetivamente.

É de salientar que quando foram misturados OEs com constituição química semelhante foi verificado o aumento de interações aditivas entre os OEs. Adicionalmente, estas misturas apresentaram reduzido potencial bactericida. Estes resultados evidenciam a importância dos componentes minoritários na inibição do crescimento bacteriano.

Os ensaios em citometria de fluxo permitiram confirmar a veracidade dos ensaios em *checkerboard*, assim como inferir sobre os principais mecanismos de ação dos OEs. Na concentração mais elevada da mistura verificou-se a ocorrência de lise celular nas quatro estirpes bacterianas testadas. A concentração correspondente ao valor de CMI da mistura induziu alterações morfológicas nas células. Foi também possível observar mecanismos de resistência nas populações de *E. coli* LFG 1003 e *P. aeruginosa* LFG 1002, quando submetidas a uma atmosfera com uma concentração reduzida de OE.

Na avaliação da toxicidade dos óleos essenciais face a *Artemia salina*, os OEs em estudo apresentaram toxicidade com valores de CL_{50} compreendidos entre $35 < CL_{50} < 214 \mu\text{g/mL}$. Assim, é crucial a redução da concentração de OE a utilizar para fins fitoterapêuticos. Nesta perspetiva, as misturas de OE apresentam uma solução sustentável na utilização de OEs eficazes como antimicrobianos e com concentração reduzida, reduzindo o risco de efeitos adversos.

Na avaliação da toxicidade «*in vivo*», os valores de DL_{50} foram de 550 mg/kg para o OE de *M. pulegium*, sendo este o OE que apresentou maior toxicidade quando testado em ratinhos *Swiss*. Para o OE de *M. spicata*, observou-se um valor de DL_{50} superior a 500 mg/kg e para os restantes OEs em estudo, o valor de DL_{50} observado foi igual ou superior a 2000 mg/kg, sugerindo a sua baixa toxicidade.

Assim, é possível concluir que os OEs e misturas destas plantas autóctones do Alentejo apresentaram propriedades promissoras como agentes antimicrobianos naturais. Os resultados obtidos sugerem a possível utilização destes OEs como agentes fitofarmacêuticos, todavia, é necessário aprofundar o conhecimento sobre as propriedades biológicas dos mesmos.

No sentido de aprofundar o conhecimento sobre as propriedades biológicas dos OEs em estudo, seria revelante prosseguir os seguintes estudos:

- Avaliar o mecanismo de ação exato de OEs e misturas em ensaios de microscopia de varrimento eletrónico, com vista a determinação da especificidade dos mesmos;
- Proceder à avaliação antimicrobiana de OEs de épocas diferentes;
- Avaliar o potencial analgésico e antioxidante de misturas de OEs.
- Realizar ensaios de toxicidade de misturas de OEs em *A. salina* e ratinhos.

7. Referências bibliográficas

- Adonizio, A. L., Downum, K., Bennett, B. C., Mathee, K. (2006). Anti-quorum sensing activity of medicinal plants in southern Florida. *Journal of Ethnopharmacology*, 105(3), 427-435.
- Adrar, N., Oukil, N., Bedjou, F. (2016). Antioxidant and antibacterial activities of *Thymus numidicus* and *Salvia officinalis* essential oils alone or in combination. *Industrial Crops and Products*, 88, 112–119.
- Aggarwal, K. K., Khanuja, S. P. S., Ahmad, A., Gupta, V. K., Kumar, S. (2002). Antimicrobial activity profiles of the two enantiomers of limonene and carvone isolated from the oils of *Mentha spicata* and *Anethum sowa*. *Flavour and Fragrance Journal*, 17(1), 59–63.
- Ait-ouazzou, A., Lorán, S., Arakrak, A., Laglaoui, A., Rota, C., Herrera, A., Pagán, R., Conchello, P. (2012). Evaluation of the chemical composition and antimicrobial activity of *Mentha pulegium*, *Juniperus phoenicea*, and *Cyperus longus* essential oils from Morocco. *FRIN*, 45(1), 313–319.
- Aloush, V., Navon-venezia, S., Seigman-igra, Y., Cabili, S., Carmeli, Y. (2006). Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Risk Factors and Clinical Impact. *Society*, 50(1), 43–48.
- Ambrosio, C. M. S., de Alencar, S. M., de Sousa, R. L. M., Moreno, A. M., Da Gloria, E. M. (2017). Antimicrobial activity of several essential oils on pathogenic and beneficial bacteria. *Industrial Crops and Products*, 97, 128–136.
- Aprotosoiaie, A. C., Gille, E., Trifan, A., Luca, V. S., & Miron, A. (2017). Essential oils of *Lavandula* genus: a systematic review of their chemistry. *Phytochemistry Reviews*, 16(4), 761–799.
- Arantes, S., Candeias, F., Lopes, O., Lima, M., Pereira, M., Tinoco, T., Cruz-Morais, J., Martins, M. R. (2016). Pharmacological and toxicological studies of essential oil of *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri*. *Planta Medica*, 82(14), 1266–1273.
- Asbahani, A. E., Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E. H. A., Casabianca, H., Mousadik, A. E., Hartmann, D., Jilale, A., Renaud, F. N. R., Elaissari, A. (2015). Essential oils: From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 483(1–2), 220–243.
- Azizi, A., Yan, F., Honermeier, B. (2009). Herbage yield, essential oil content and composition of three oregano (*Origanum vulgare* L.) populations as affected by soil moisture regimes and nitrogen supply. *Industrial Crops and Products*, 29(2–3), 554–561.
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., Omar, A. K. M. (2013). Techniques

for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426–436.

- Bag, A., Chattopadhyay, R. R. (2015). Evaluation of synergistic antibacterial and antioxidant efficacy of essential oils of spices and herbs in combination. *PLoS ONE*, 10(7), 1–17.
- Bagnoli, F., Rappuoli, R., & Grandi, G. (2018). *Staphylococcus aureus: Microbiology, Pathology, Immunology, Therapy and Prophylaxis*. Springer International Publishing.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446–475.
- Baldovini, N., Lavoine-Hanneguelle, S., Ferrando, G., Dusart, G., Lizzani-Cuvelier, L. (2005). Necrodane monoterpenoids from *Lavandula luisieri*. *Phytochemistry*, 66(14), 1651–1655.
- Baldovini, N., Ristorcelli, D., Tomi, F., Casanova, J. (2000). Intraspecific variability of the tesselential oil of *Calamintha nepeta* from Corsica (France). *Flavour and Fragrance Journal*, 15(1), 50–54.
- Balunas, M. J., Kinghorn, A. D. (2005). Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences*, 78(5), 431–441.
- Baptista, R., Madureira, A. M., Jorge, R., Adão, R., Duarte, A., Duarte, N., Lopes, M. M., Teixeira, G. (2015). Antioxidant and antimycotic activities of two native *Lavandula* species from Portugal. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.
- Barry, A. L., Craig, W. A., Nadler, H., Reller, L. B., Sanders, C. C., Swenson, J. M. (1999). Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; approved guideline. National Committee for Clinical Laboratory Standards (Vol. 19).
- Bassolé, I. H. N., Juliani, H. R. (2012). Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*, 17(4), 3989–4006.
- Bassolé, I. H. N., Lamien-Meda, A., Bayala, B., Obame, L. C., Ilboudo, A. J., Franz, C., Novak, J., Nebié, R.C., Dicko, M. H. (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon giganteus* essential oils alone and in combination. *Phytomedicine*, 18(12), 1070–1074.
- Bastos, M., Lima, M. R. F., Conserva, L. M., Andrade, V. S., Rocha, E. M. M., Lemos, R. P. L. (2009). Studies on the antimicrobial activity and brine shrimp toxicity of *Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bur. (Bignoniaceae) extracts and their main constituents. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 8, 1–6.
- Benabdelkader, T., Guitton, Y., Pasquier, B., Magnard, J. L., Jullien, F., Kameli, A., Legendre, L. (2015). Functional characterization of terpene synthases and chemotypic variation in three lavender species of section *stoechas*. *Physiologia Plantarum*, 153(1), 43–57.

- Bernhoft, A. (2010). A brief review on bioactive compounds in plants. Bioactive compounds in plants - benefits and risks for man and animals (Vol. 50).
- Bouazama, S., Hicham, H., Costa, J., Desjobert, J. M., Talbaoui, A., Tabyaoui, M. ohamé. (2017). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oils of *Lavandula pedunculata* and *Lavandula dentata*, *Journal of Materials and Environmental Sciences*, 8(6), 2154–2160.
- Boukhebti, H., Chaker, A. N., Belhadj, H., Sahli, F., Laouer, H., Harzallah, D. (2011). Chemical composition and antibacterial activity of *Mentha pulegium* L. and *Mentha spicata* L. essential oils, *Scholar Research Library*, 3(4), 267–275.
- Bouzouita, N., Kachouri, F., Hamdi, M., Chaabouni, M. M., Aissa, R. Ben, Zgoulli, S., Thonart, P., Carlier, A., Marlier, M., Lognay, G. C. (2005). Volatile constituents and antimicrobial activity of *Lavandula stoechas* L. Oil from Tunisia. *Journal of Essential Oil Research*, 17(5), 584–586.
- Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Simin, N., Anackov, G. (2006). Characterization of the volatile composition of essential oils of some *Lamiaceae* spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(5), 1822–1828.
- Božovic, M., Garzoli, S., Sabatino, M., Pepi, F., Baldisserotto, A., Andreotti, E., Romagnoli, C., Mai, A., Manfredini, S. Ragno, R. (2017). Essential oil extraction, chemical analysis and anti-candida activity of *Calamintha nepeta* (L.) Savi subsp. *glandulosa* (Req.) ball-new approaches. *Molecules*, 22(2), 1–12.
- Božović, M., Ragno, R. (2017). *Calamintha nepeta* (L.) Savi and its Main Essential Oil Constituent Pulegone: Biological Activities and Chemistry. *Molecules*, 22(2).
- Brahmi, F., Khodir, M., Mohamed, C., Pierre, D. (2017). Chemical Composition and Biological Activities of *Mentha* Species. In M. Khodir (Ed.) (p. Ch. 3). Rijeka: IntechOpen.
- Brinkman, C. L., & Patel, R. (2015). Chapter 44 - Molecular Pathogenesis of Infective Endocarditis. In Y.-W. Tang, M. Sussman, D. Liu, I. Poxton, & J. B. T.-M. M. M. (Second E. Schwartzman (Eds.) (pp. 811–822). Boston: Academic Press.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223–253.
- Candy, K., Nicolas, P., Andriantsoanirina, V., Izri, A., Durand, R. (2017). In vitro efficacy of five essential oils against *Pediculus humanus capitis*. *Parasitology Research*, 117(2), 603–609.
- Carballo, J. L., Hernández-Inda, Z. L., Pérez, P., García-Grávalos, M. D. (2002). A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnology*, 2(1), 1–5.

- Carson, C. F., Mee, B. J., Riley, T. V. (2002). Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(6), 1914–1920.
- Cavaleiro, C., Salgueiro, L. R., Miguel, M. G., & Proença Da Cunha, A. (2004). Analysis by gas chromatography-mass spectrometry of the volatile components of *Teucrium lusitanicum* and *Teucrium algarbiensis*. *Journal of Chromatography A*, 1033(1), 187–190.
- Cavanagh, H. M. A., Wilkinson, J. M. (2002). Biological activities of lavender essential oil. *Phytotherapy Research*, 16(4), 301–308.
- Cavanagh, H. M. A., Wilkinson, J. M. (2005). Lavender essential oil: a review. *Australian Infection Control*, 10(1), 35–37.
- Chang, H. Y., Wang, S. M., Chiu, N. C., Chung, H. Y., Wang, H. K. (2011). Neonatal *Morganella morganii* sepsis: a case report and review of the literature. *Pediatrics International*, 53(1), 121-123.
- Chauhan, R. S., Kaul, M. K., Shahi, A. K., Kumar, A., Ram, G., Tawa, A. (2009). Short communication Chemical composition of essential oils in *Mentha spicata* L. accession [IIIM(J)26] from North-West Himalayan region. *Industrial Crops and Products*, 9, 654–656.
- Chen, F., Tholl, D., Bohlmann, J., Pichersky, E. (2011). The family of terpene synthases in plants: A mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. *Plant Journal*, 66(1), 212–229.
- Chopra, I., Roberts, M. (2001). Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65, 232-260.
- Chu, C. J., Kemper, K. J. (2005). Lavender (*Lavandula* spp.). *Longwood Herbal Task Force*, 1–32.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2015). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Approved Standard-Tenth Edition. CLSI Document M07-A10., (January), 1–87.
- Comissão da Farmacopeia Portuguesa. Farmacopeia Portuguesa 9: Edição Oficial. Lisboa: Infarmed.
- Cosgrove, S. E., Carmeli, Y. (2003). The Impact of Antimicrobial Resistance on Health and Economic Outcomes. *Clinical Infectious Diseases*, 36(11), 1433–1437.
- Costa, P., Gonçalves, S., Valentão, P., Andrade, P. B., Almeida, C., Nogueira, J. M. F., Romano, A. (2013). Metabolic profile and biological activities of *Lavandula pedunculata* subsp. *lusitanica* (Chaytor) Franco: Studies on the essential oil and polar extracts. *Food Chemistry*, 141(3), 2501–2506.

- Costa, P., Medronho, B., Gonçalves, S., & Romano, A. (2015). Cyclodextrins enhance the antioxidant activity of essential oils from three *Lamiaceae* species. *Industrial Crops and Products*, 70, 341–346.
- Cox, S. D., Mann, C. M., Markham, J. L., Bell, H. C., Gustafson, J. E., Warmington, J. R., Wyllie, S. G. (2000). The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*, 88(1), 170–175.
- D'Antuono, L. F., Galletti, G. C., Bocchini, P. (2000). Variability of essential oil content and composition of *Origanum vulgare* L. populations from a north Mediterranean area (Liguria region, northern Italy). *Annals of Botany*, 86(3), 471–478.
- Dagli, N., Dagli, R., Mahmoud, R. S., Baroudi, K. (2015). Essential oils, their therapeutic properties, and implication in dentistry: A review. *Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry*, 5(5), 335–340.
- Davey, H. M. (2011). Life, death, and in-between: Meanings and methods in microbiology. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(16), 5571–5576.
- De Azeredo, G. A., Stamford, T. L. M., Nunes, P. C., Gomes Neto, N. J., De Oliveira, M. E. G., De Souza, E. L. (2011). Combined application of essential oils from *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. to inhibit bacteria and autochthonous microflora associated with minimally processed vegetables. *Food Research International*, 44(5), 1541–1548.
- De Oliveira, C. E. V., Stamford, T. L. M., Neto, N. J. G., de Souza, E. L. (2010). Inhibition of *Staphylococcus aureus* in broth and meat broth using synergies of phenolics and organic acids. *International Journal of Food Microbiology*, 137(2–3), 312–316.
- Déciga-Campos, M., Rivero-Cruz, I., Arriaga-Alba, M., Castañeda-Corral, G., Angeles-López, G. E., Navarrete, A., Mata, R. (2007). Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 110(2), 334–342.
- Delaquis, P. J., Stanich, K., Girard, B., Mazza, G. (2002). Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 74, 101–109.
- Dias, M. C., Almeida, R., Romano, A. (2002). Rapid clonal multiplication of *Lavandula viridis* L'Heér through in vitro axillary shoot proliferation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 68(1), 99–102.
- Díaz-Maroto, M. C., Castillo, N., Castro-vázquez, L., González-viñas, M. Á., Pérez-coello, M. S. (2007). Volatile composition and olfactory profile of pennyroyal (*Mentha pulegium* L.) plants. *Flavour and Fragrance Journal*, 22, 114–118.
- Dockrell, D. H. (2001). Apoptotic cell death in the pathogenesis of infectious diseases. *Journal of Infection*, 42(4), 227–234.

- Dorman, H. J., Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2), 308–316.
- Duru, M. E., Öztürk, M., Uğur, A., Ceylan, Ö. (2004). The constituents of essential oil and in vitro antimicrobial activity of *Micromeria cilicica* from Turkey. *Journal of Ethnopharmacology*, 94(1), 43–48.
- Edris, E. A. (2007). Pharmaceutical and therapeutic Potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytotherapy Research*, 21(4), 308–323.
- Engeland, M. V., Nieland, L. J. W., Ramaekers, F. C. S., Schutte, B., Reutelingsperger, C. P. M. (1998). A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Proc. Natl. Ac. Sci. USA*, 93(4), 1–9.
- Engelkirk, P. G., & Duben-Engelkirk, J. L. (2008). *Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases: Essentials of Diagnostic Microbiology*. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- Espina, L., García-Gonzalo, D., Laglaoui, A., Mackey, B. M., Pagán, R. (2013). Synergistic combinations of high hydrostatic pressure and essential oils or their constituents and their use in preservation of fruit juices. *International Journal of Food Microbiology*, 161(1), 23–30.
- Fadli, M., Saad, A., Sayadi, S., Chevalier, J., Mezrioui, N. E., Pags, J. M., Hassani, L. (2012). Antibacterial activity of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* essential oils against nosocomial infection - Bacteria and their synergistic potential with antibiotics. *Phytomedicine*, 19(5), 464–471.
- Fey, P. D. (2013). *Staphylococcus Epidermidis: Methods and Protocols*. Humana Press.
- Fisher, K., Phillips, C. (2008). Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? *Trends in Food Science and Technology*, 19(3), 156–164.
- Flamini, G., Cioni, P. L., Puleio, R., Morelli, I., Panizzi, L. (1999). Antimicrobial activity of the essential oil of *Calamintha nepeta* and its constituent pulegone against bacteria and fungi. *Phytotherapy Research*, 13(4), 349–351.
- Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M., Hultgren, S. J. (2015). Urinary tract infections: Epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature Reviews Microbiology*, 13(5), 269–284.
- Frank, D. W. (2012). Research topic on *Pseudomonas aeruginosa*, biology, genetics, and host-pathogen interactions. *Frontiers in Microbiology*, 3, 4-5.
- Franklin, M., Nivens, D. E., Weadge, J. T., Howell, P. L. (2011). Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* extracellular polysaccharides, alginate, Pel, and Psl. *Frontiers in Microbiology*, 2.
- Gallucci, M. N., Oliva, M., Casero, C., Dambolena, J., Luna, A., Zygadlo, J., Demo, M. (2009). Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne

microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*.
Flavour and Fragrance Journal, 24(6), 348–354.

- Gavahian, M., Farahnaky, A., Javidnia, K., Majzoobi, M. (2012). Comparison of ohmic-assisted hydrodistillation with traditional hydrodistillation for the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L.. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 14, 85–91.
- Gianella, R. A. (1996). Chapter 21 Salmonella in Medical Microbiology. 4ª edição. Galveston (TX).
- Gonçalves, S., Serra, H., Nogueira, J. M. F., Almeida, R., Custódio, L., Romano, A. (2008). Headspace-SPME of in vitro shoot-cultures and micropropagated plants of *Lavandula viridis*. *Biologia Plantarum*, 52(1), 133–136.
- Goñi, P., López, P., Sánchez, C., Gómez-Lus, R., Becerril, R., Nerín, C. (2009). Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chemistry*, 116(4), 982–989.
- González-Coloma, A., Delgado, F., Rodilla, J. M., 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), 1–8.
- Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., Bourke, P. (2008). The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology*, 124(1), 91–97.
- Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., Bourke, P. (2009). Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components. *Food Microbiology*, 26(2), 142–150.
- Hajlaoui, H., Trabelsi, N., Noumi, E., Snoussi, M., Fallah, H., Ksouri, R. (2009). Biological activities of the essential oils and methanol extract of two cultivated mint species (*Mentha longifolia* and *Mentha pulegium*) used in the Tunisian folkloric medicine, *World J Microbiol Biotechnol*, 25, 2227–2238.
- Hamidi, M. R., Jovanova, B., Panovska, T. K. (2014). Toxicological evaluation of the plant products using Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) model. *Macedonian Pharmaceutical Bulletin*, 60(1), 9–18.
- Harris, R. (2002). Synergism in the essential oil world. *International Journal of Aromatherapy*, 12 (4), 179–186.
- Helander, I. M., Alakomi, H. (1998). Characterization of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 3590–3595.
- Henry, C. M., Hollville, E., Martin, S. J. (2013). Measuring apoptosis by microscopy and flow cytometry. *Methods*, 61, 90-97.

- Hingorani, R., Deng, J., Elia, J., McIntyre, C., Mittar, D. (2011). Detection of Apoptosis Using the BD Annexin V FITC Assay on the BD FACSVerse™ System. *BD Biosciences*, August, 1–12.
- Hong, E.-J., Na, K.-J., Choi, I.-G., Choi, K.-C., Jeung, E.-B. (2004). Antibacterial and Antifungal Effects of Essential Oils from Coniferous Trees. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 27 (6), 863–866.
- Horvath, D. J., Li, B., Casper, T., Partida-Sanchez, S., Hunstad, D. A., Hultgren, S. J., Justice, S. S. (2011). Morphological plasticity promotes resistance to phagocyte killing of uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbes and Infection*, 13(5), 426–437.
- Hua, C. X., Wang, G. R., Lei, Y. (2011). Evaluation of essential oil composition and DNA diversity of mint resources from China. *African Journal of Biotechnology*, 10(74), 16740–16745.
- Huie, C. W. (2002). A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 373, 23–30.
- Hyltdgaard, M., Mygind, T., Meyer, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, 3, 1–24.
- Keer, J. T., Birch, L. (2003). Molecular methods for the assessment of bacterial viability. *Journal of Microbiological Methods*, 53(2), 175–183.
- Khan, M. M. T., Pyle, B. H., Camper, A. K. (2010). Specific and rapid enumeration of viable but nonculturable and viable-culturable gram-negative bacteria by using flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(15), 5088–5096.
- Knezevic, P., Aleksic, V., Simin, N., Svircev, E., Petrovic, A., Mimica-Dukic, N. (2016). Antimicrobial activity of *Eucalyptus camaldulensis* essential oils and their interactions with conventional antimicrobial agents against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Ethnopharmacology*, 178, 125–136.
- Koroch, A. R., Rodolfo Juliani, H., Zygodlo, J. A. (2007). Bioactivity of Essential Oils and Their Components. In R. G. Berger (Ed.), *Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability* (pp. 87–115). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., Nychas, G. J. E. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91(3), 453–462.
- Lang, G., Buchbauer, G. (2012). A review on recent research results (2008-2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 27 (1), 13–39.

- Lavoine Hanneguelle, S., Casabianca, H. (2004). New compounds from the essential oil and absolute of *Lavandula luisieri* L. *Journal of Essential Oil Research*, 16(5), 445–448.
- Lis-Balchin, M. (2003). *Lavender: The Genus Lavandula*. CRC Press.
- Lis-Balchin, M., Deans, S. G., & Eaglesham, E. (1998). Relationship between bioactivity and chemical composition of commercial essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 13(2), 98–104.
- Gričić, L. M., Unković, N., Dimkić, I., Janačković, P., Gavrilović, M., Stanojević, O., Stupar, M., Vujisić, L., Jelikić, A., Stanković, S., Vukojević, J. (2018). Frankincense and myrrh essential oils and burn incense fume against micro-inhabitants of sacral ambients. Wisdom of the ancients? *Journal of Ethnopharmacology*, 219, 1–14.
- Lovkova, M. Y., Buzuk, G. N., Sokolova, S. M., Kliment'eva, N. I. (2001). Chemical Features of Medicinal Plants (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 37(3), 229–237.
- Lukas, B., Schmiderer, C., Novak, J. (2015). Essential oil diversity of European *Origanum vulgare* L. (*Lamiaceae*). *Phytochemistry*, 119, 32–40.
- Lv, F., Liang, H., Yuan, Q., Li, C. (2011). In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. *Food Research International*, 44(9), 3057–3064.
- Mackay, M. L., Milne, K., Gould, I. M. (2000). Comparison of methods for assessing synergic antibiotic interactions. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 15(2), 125–129.
- Magi, G., Marini, E., Facinelli, B. (2015). Antimicrobial activity of essential oils and carvacrol, and synergy of carvacrol and erythromycin, against clinical, erythromycin-resistant Group A Streptococci. *Frontiers in Microbiology*, 6.
- Mahboubi, M., Kazempour, N. (2009). The Antimicrobial Activity of Essential Oil from *Perovskia abrotanoides* Karel and its Main Components. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 71(3), 343–347.
- Maldonado, F., Packard, T. T., Gómez, M. (2012). Understanding tetrazolium reduction and the importance of substrates in measuring respiratory electron transport activity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 434–435, 110–118.
- Marongiu, B., Piras, A., Porcedda, S., Falconieri, D., Maxia, A., Goncalves, M. J., Cavaleiro, C. Salgueiro, L. (2010). Chemical composition and biological assays of essential oils of *Calamintha nepeta* (L.) Savi subsp. *nepeta* (*Lamiaceae*). *Natural Product Research*, 24 (18), 1734–1742.
- Martino, L. De, Feo, V. De, Formisano, C., Mignola, E., Senatore, F. (2009). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from three chemotypes of

Origanum vulgare L. ssp. *hirtum* (Link) ietswaart growing wild in campania (Southern Italy). *Molecules*, 14(8), 2735–2746.

- Martins, M. R., Arantes, S., Candeias, F., Tinoco, M. T., Cruz-Morais, J. (2014). Antioxidant, antimicrobial and toxicological properties of *Schinus molle* L. essential oils. *Journal of Ethnopharmacology*, 151(1), 485–492.
- Martins, M. R., Tinoco, M. T., Almeida, A. S., Cruz-Morais, J. (2012). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of three essential oils from portuguese flora. *Journal of Pharmacognosy*, 3(1), 39–44.
- Mata, A. T., Proença, C., Ferreira, A. R., Serralheiro, M. L. M., Nogueira, J. M. F., Araújo, M. E. M. (2007). Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food Chemistry*, 103(3), 778–786.
- Matos, F., Miguel, M. G., Duarte, J., Venâncio, F., Moiteiro, C., Correia, A. I. D., Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., Pedro, L. G. (2009). Antioxidant Capacity of the Essential Oils from *Lavandula luisieri*, *L. stoechas* subsp. *Iusitanica*, *L. stoechas* subsp. *Iusitanica* x *L. luisieri* and *L. viridis* Grown in Algarve (Portugal). *Journal of Essential Oil Research*, 21(4), 327–336.
- Mockute, D., Bernotiene, G., Judzentiene, A. (2001). The essential oil of *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare* growing wild in Vilnius district (Lithuania). *Phytochemistry*, 57(1), 65–69.
- Monteiro, J. M., Fernandes, P. B., Vaz, F., Pereira, A. R., Tavares, A. C., Ferreira, M. T., Pereira, P. M., Veiga, H., Kuru, E., VanNieuwenhze, M. S., Brun, Y. V., Filipe, S. R., Pinho, M. G. (2015). Cell shape dynamics during the staphylococcal cell cycle. *Nature Communications*, 6.
- Moreira, M. R., Ponce, A. G., Del Valle, C. E., Roura, S. I. (2005). Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT - Food Science and Technology*, 38(5), 565–570.
- Mosher, J. J., Levison, B. S., & Johnston, C. G. (2003). A simplified dehydrogenase enzyme assay in contaminated sediment using 2-(p-iodophenyl)-3(p-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride. *Journal of Microbiological Methods*, 53(3), 411–415.
- Mottram, R. (2007). The LRI and Odour Database. Flavour Research Group, School of Food Biosciences, University of Reading, UK.
- Mulyaningsih, S., Sporer, F., Zimmermann, S., Reichling, J., Wink, M. (2010). Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. *Phytomedicine*, 17(13), 1061–1066.
- Mun, S. H., Joung, D. K., Kim, Y. S., Kang, O. H., Kim, S. B., Seo, Y. S., Kim, Y. C., Lee, D. S., Shin, S. W., Kweon, K. T., Kwon, D. Y. (2013). Synergistic antibacterial effect

of curcumin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytomedicine*, 20(8–9), 714–718.

- N'dédianhoua, K. S., Majdouli, K., Khabbal, Y., Zaïr, T. (2014). Chemical composition and antibacterial activity of *Lavandula* species *L. dentata* L., *L. pedunculata* Mill and *Lavandula abrialis* essential oils from Morocco against food-borne and nosocomial pathogens. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 7(2), 774.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, approved standard. (NCCLS document M2-A8) (8a edição). Wayne. PA.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., De Feo, V. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1451–1474.
- Negro, C., Notarnicola, S., De Bellis, L., Miceli, A. (2013). Intraspecific variability of the essential oil of *Calamintha nepeta* subsp. *nepeta* from Southern Italy (Apulia). *Natural Product Research*, 27(4–5), 331–339.
- Nikkhah, M., Hashemi, M., Habibi Najafi, M. B., Farhoosh, R. (2017). Synergistic effects of some essential oils against fungal spoilage on pear fruit. *International Journal of Food Microbiology*, 257, 285–294.
- Nogueira, J. M. F., Romano, A. (2002). Essential oils from micropropagated plants of *Lavandula viridis*. *Phytochemical Analysis*, 13(1), 4–7.
- Oliver, J. D. (2005). The viable but nonculturable state in bacteria. *Journal of Microbiology*, 43, 93–100.
- Owen, L., Laird, K. (2018). Synchronous application of antibiotics and essential oils: dual mechanisms of action as a potential solution to antibiotic resistance. *Critical Reviews in Microbiology*, 44(4), 414–435.
- Parra, A. L., Yhebra, R. S., Sardiñas, I. G., Buela, L. I. (2001). Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD₅₀ value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*, 8(5), 395–400.
- Pauli, A., Schilcher, H. (2010). In vitro antimicrobial activities of essential oils monographed in the European Pharmacopoeia 6th Edition. In K. Baser & G. Buchbauer (Eds.), *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications*. CRC Press.
- Pavela, R., Benelli, G. (2016). Essential Oils as Ecofriendly Biopesticides? Challenges and Constraints. *Trends in Plant Science*, 21(12), 1000–1007.
- Pei, R. S., Zhou, F., Ji, B. P., Xu, J. (2009). Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved method. *Journal of Food Science*, 74(7), 379–383.

- Penchovsky, R., Traykovska, M. (2015). Designing drugs that overcome antibacterial resistance: where do we stand and what should we do? *Expert Opinion on Drug Discovery*, 10(6), 631–650.
- Petrakis, E. A., Kimbaris, A. C., Pappas, C. S., Tarantilis, P. A., Polissiou, M. G. (2009). Quantitative determination of pulegone in pennyroyal oil by FT-IR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (21), 10044–10048.
- Petrovska, B. B. (2012). Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacognosy Reviews*, 6(11), 1–5.
- Pietkiewicz, S., Schmidt, J. H., Lavrik, I. N. (2015). Quantification of apoptosis and necroptosis at the single cell level by a combination of Imaging Flow Cytometry with classical Annexin V/propidium iodide staining. *Journal of Immunological Methods*, 423, 99–103.
- Ponce, A. G., Fritz, R., Del Valle, C., Roura, S. I. (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LWT - Food Science and Technology*, 36(7), 679–684.
- Quach, D. T., Sakoulas, G., Nizet, V., Pogliano, J., Pogliano, K. (2016). Bacterial Cytological Profiling (BCP) as a Rapid and Accurate Antimicrobial Susceptibility Testing Method for *Staphylococcus aureus*. *EBioMedicine*, 4, 95–103.
- Rather, P. N. (2005). Swarmer cell differentiation in *Proteus mirabilis*. *Environmental Microbiology*, 7(8), 1065-1073.
- Raut, J. S., Karuppayil, S. M. (2014). A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products*, 62, 250–264.
- Reis-Vasco, E. M. C., Coelho, J. A. P., Palavra, A. M. F. (1999). Comparison of pennyroyal oils obtained by supercritical CO₂ extraction and hydrodistillation. *Flavour and Fragrance Journal*, 14(3), 156–160.
- Rhind, J. P. (2015). *Aromatherapeutic Blending: Essential Oils in Synergy*. Jessica Kingsley Publishers.
- Roller, S., Ernest, N., & Buckle, J. (2009). The antimicrobial activity of high-necrodane and other lavender oils on methicillin-sensitive and -resistant *Staphylococcus aureus* (MSSA and MRSA). *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 15(3), 275–279.
- Romano, C. S., Abadi, K., Repetto, V., Vojnov, A. A., Moreno, S. (2009). Synergistic antioxidant and antibacterial activity of rosemary plus butylated derivatives. *Food Chemistry*, 115(2), 456–461.
- Rosato, A., Vitali, C., De Laurentis, N., Armenise, D., Antonietta Milillo, M. (2007). Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with Norfloxacin. *Phytomedicine*, 14(11), 727–732.

- Sahin, F., Güllüce, M., Daferera, D., Sökmen, A., Sökmen, M., Polissiou, M., Agar, G., Özer, H. (2004). Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control*, 15(7), 549–557.
- Sakkas, H., Gousia, P., Economou, V., Sakkas, V., Petsios, S., Papadopoulou, C. (2016). In vitro antimicrobial activity of five essential oils on multi-drug resistant Gram-negative clinical isolates. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, 5(3), 212-218.
- Saljoughian, S., Roohinejad, S., Bekhit, A. E. A., Greiner, R., Omidzadeh, A., Nikmaram, N., Khaneghah, A. M. (2017). The effects of food essential oils on cardiovascular diseases: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(10), 1688-1707.
- Santiesteban-López, A., Palou, E., López-Malo, A. (2006). Susceptibility of food-borne bacteria to binary combinations of antimicrobials at selected aw and pH. *Journal of Applied Microbiology*, 102(2), 486–497.
- Sanz, J., Soria, A. C., García-Vallejo, M. C. (2004). Analysis of volatile components of *Lavandula luisieri* L. by direct thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1024, 139–146.
- Shahbazi, Y. (2015). Chemical Composition and In Vitro Antibacterial Activity of *Mentha spicata* Essential Oil against Common Food-Borne Pathogenic Bacteria. *Journal of Pathogens*.
- Singh, P. K., Tack, B. F., McCray, P. B., Welsh, M. J. (2000). Synergistic and additive killing by antimicrobial factors found in human airway surface liquid. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 279(5), L799–L805.
- Sivropoulou, A., Kokkini, S., Lanaras, T., Arsenakis, M. (1995). Antimicrobial Activity of Mint Essential Oils, *J. Agric. Food Chem.*, 43, 2384–2388.
- Snoussi, M., Noumi, E., Trabelsi, N., Flamini, G., Papetti, A., De Feo, V. (2015). *Mentha spicata* Essential Oil: Chemical Composition, Antioxidant and Antibacterial Activities against Planktonic and Biofilm Cultures of *Vibrio* spp. Strains. *Molecules*, 20(8), 14402–14424.
- Soković, M., Glamočlija, J., Ćirić, A. (2013). Natural Products from Plants and Fungi as Fungicides. *Fungicides - Showcases of Integrated Plant Disease Management from Around the World*, 185–232.
- Soković, M., Glamočlija, J., Marin, P. D., Brkić, D., Griensven, L. J. L. D. van. (2010). Antibacterial Effects of the Essential Oils of Commonly Consumed Medicinal Herbs Using an In Vitro Model. *Molecules*, 15(11), 7532–7546.

- Souza, E. L., Stamford, T. L. M., Lima, E. O., Trajano, V. N. (2007). Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. *Food Control*, 18(5), 409–413.
- Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., Ouellette, M., Outtersson, K., Patel, J., Cavaleri, M., Cox, E. M., Houchens, C. R., Grayson, M. L., Hansen, P., Singh, N., Theuretzbacher, U., Magrini, N., WHO Pathogens Priority List Working Group (2017). Discovery, research, and development of new antibiotics: The WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases*, 3099(17), 1–10.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2010). Plant Physiology. *Annals of Botany*.
- Talbaoui, A., Jamaly, N., Aneb, M., Idrissi, A., Bouksaim, M., Gmouh, S., Amzazi, S., Moussaouiti, M., Benjouad, A., Bakri, Y. (2012). Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from six Moroccan plants. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(31), 4593–4600.
- Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Neng, N. R., Nogueira, J. M. F., Saraiva, J. A., Nunes, M. L. (2013). Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. *Industrial Crops and Products*, 43(1), 587–595.
- 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(11), 2707–2714.
- Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., Denamur, E. (2010). The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Natures Reviews Microbiology*, 8(3), 207-217.
- Timurkaynak, F., Can, F., Azap, Ö. K., Demirbilek, M., Arslan, H., Karaman, S. Ö. (2006). In vitro activities of non-traditional antimicrobials alone or in combination against multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care units. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 27(3), 224–228.
- Tserennadmid, R., Takó, M., Galgóczy, L., Papp, T., Pesti, M., Vágvölgyi, C., Almássy, K., Krisch, J. (2011). Anti yeast activities of some essential oils in growth medium, fruit juices and milk. *International Journal of Food Microbiology*, 144(3), 480–486.
- Vale-Silva, L., Silva, M. J., Oliveira, D., Gonçalves, M. J., Cavaleiro, C., Salgueiro, L., Pinto, E. (2012). Correlation of the chemical composition of essential oils from *Origanum vulgare* subsp. *virens* with their in vitro activity against pathogenic yeasts and filamentous fungi. *Journal of Medical Microbiology*, 61(2), 252–260.

- Veldhuizen, E. J. A., Bokhoven, J. L. M. T., Zweijtzer, C., Burt, S. A., Haagsman, H. P. (2006). Structural Requirements for the Antimicrobial Activity of Carvacrol. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 1874–1879.
- Vian, M. A., Fernandez, X., Visinoni, F., Chemat, F. (2008). Microwave hydrodiffusion and gravity, a new technique for extraction of essential oils. *Journal of Chromatography A*, 1190(1–2), 14–17.
- Vieira, M., Bessa, L. J., Martins, M. R., Arantes, S., Teixeira, A. P. S., Mendes, Â., Costa, P. M., Belo, A. D. F. (2017). Chemical Composition, Antibacterial, Antibiofilm and Synergistic Properties of Essential Oils from *Eucalyptus globulus* Labill. and Seven Mediterranean Aromatic Plants. *Chemistry and Biodiversity*, 14(6).
- Vogel, H. G., Vogel, W. H. (2013). Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays. Springer Berlin Heidelberg.
- Wang, Y. ming, Kong, L. cong, Liu, J., Ma, H. xia. (2018). Synergistic effect of eugenol with Colistin against clinical isolated Colistin-resistant *Escherichia coli* strains. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 7(1), 1–9.
- Woronuk, G., Demissie, Z., Rheault, M., Mahmoud, S. (2011). Biosynthesis and therapeutic properties of *Lavandula* essential oil constituents. *Planta Medica*, 77(1), 7–15.
- Yap, P. S. X., Lim, S. H. E., Hu, C. P., Yiap, B. C. (2013). Combination of essential oils and antibiotics reduce antibiotic resistance in plasmid-conferred multidrug resistant bacteria. *Phytomedicine*, 20(8–9), 710–713.
- Yu, H., He, X., Xie, W., Xiong, J., Sheng, H., Guo, S., Huang, C., Zhang, D., Zhang, K. (2014). Elastase LasB of *Pseudomonas aeruginosa* promotes biofilm formation partly through rhamnolipid-mediated regulation. *Canadian Journal of Microbiology*, 60(4), 227–235.
- Zengin, H., Baysal, A. H. (2014). Antibacterial and antioxidant activity of essential oil terpenes against pathogenic and spoilage-forming bacteria and cell structure-activity relationships evaluated by SEM microscopy. *Molecules*, 19(11), 17773–17798.
- Zhou, X., Li, Y. B. T. (2015). Chapter 4 - Subgingival Microbes. In X. Zhou & Y. B. T.-A. of O. M. Li (Eds.), *Atlas of Oral Microbiology* (pp. 67–93). Oxford: Academic Press.
- Zhu, X., Zhang, H., Lo, R. (2004). Phenolic compounds from the leaf extract of artichoke (*Cynara scolymus* L.) and their antimicrobial activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7272–7278.
- Zore, G. B., Thakre, A. D., Jadhav, S., Karuppayil, S. M. (2011). Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. *Phytomedicine*, 18(13), 1181–1190.

Zuzarte, M., Gonçalves, M. J., Cavaleiro, C., Canhoto, J., Vale-Silva, L., Silva, M. J., Pinto, E., Salgueiro, L. (2011). Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Lavandula viridis* L'Hér. *Journal of Medical Microbiology*, 60(5), 612–618.

Zuzarte, M., Gonçalves, M. J., Cavaleiro, C., Dinis, A. M., Canhoto, J. M., & Salgueiro, L. R. (2009). Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Lavandula pedunculata* (MILLER) CAV. *Chemistry and Biodiversity*, 6(8), 1283–1292.

Zuzarte, M., Gonçalves, M. J., Cruz, M. T., Cavaleiro, C., Canhoto, J., Vaz, S., Pinto, E., Salgueiro, L. (2012). *Lavandula luisieri* essential oil as a source of antifungal drugs. *Food Chemistry*, 135(3), 1505–1510.

Zuzarte, M. R., Dinis, A. M., Cavaleiro, C., Salgueiro, L. R., Canhoto, J. M. (2010). Trichomes, essential oils and in vitro propagation of *Lavandula pedunculata* (*Lamiaceae*). *Industrial Crops and Products*, 32(3), 580–587.

Sites consultados:

- <http://www.flora-on.pt>, consultado durante o mês de setembro;
- <http://www.floraiberica.es>, consultado durante o mês de setembro;
- <http://www.jb.utad.pt>, consultado durante o mês de setembro.

8. Anexos

I. Avaliação do efeito sinérgico das misturas de OEs

Tabela 14 Valores de índice de concentração inibitória fracionada (FIC) e interação entre os óleos essenciais, do género *Lavandula* e de *C. nepeta*.

Microrganismo	Óleo essencial misturado	FIC	Interação
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>L. luisieri</i>	1,25	Aditivo
	<i>L. pedunculata</i>	0,35	Sinérgico total
	<i>L. viridis</i>	0,52	Sinérgico total
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>L. luisieri</i>	0,52	Sinérgico total
	<i>L. pedunculata</i>	0,51	Sinérgico total
	<i>L. viridis</i>	0,70	Sinérgico parcial
<i>S. aureus</i> LFG 1007	<i>L. pedunculata</i>	0,04	Sinérgico total
	<i>L. viridis</i>	1,03	Aditivo
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	<i>L. luisieri</i>	1,10	Aditivo
	<i>L. pedunculata</i>	0,41	Sinérgico total
<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>L. luisieri</i>	1,04	Aditivo
	<i>L. pedunculata</i>	0,96	Aditivo
<i>E. coli</i> LFG 1003	<i>L. luisieri</i>	0,79	Aditivo
	<i>L. pedunculata</i>	0,54	Sinérgico total
<i>M. morgani</i> LFG 08	<i>L. luisieri</i>	0,51	Sinérgico total
	<i>L. pedunculata</i>	0,53	Sinérgico total
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>L. pedunculata</i>	0,54	Sinérgico total
<i>P. aeruginosa</i> LFG 1002	<i>L. pedunculata</i>	0,58	Sinérgico parcial
	<i>L. viridis</i>	0,46	Sinérgico total
<i>P. mirabilis</i> LFG 1004	<i>L. luisieri</i>	2,47	Aditivo
	<i>L. pedunculata</i>	0,51	Sinérgico total
<i>S. enteritidis</i> LFG 1005	<i>L. luisieri</i>	0,64	Sinérgico parcial
	<i>L. pedunculata</i>	0,16	Sinérgico total
<i>S. typhimurium</i> LFG 1006	<i>L. luisieri</i>	0,71	Sinérgico parcial
	<i>L. pedunculata</i>	0,65	Sinérgico parcial

Tabela 15 Valores de índice de concentração inibitória fracionada (FIC) e interação entre os óleos essenciais, do género *Mentha* e de *C. nepeta*.

Microrganismo	Óleo essencial misturado	FIC	Interação
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>M. pulegium</i>	0,51	Sinergético total
	<i>M. spicata</i>	0,50	Sinergético total
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>M. pulegium</i>	0,46	Sinergético total
	<i>M. spicata</i>	0,58	Sinergético parcial
<i>S. aureus</i> LFG 1007	<i>M. pulegium</i>	0,40	Sinergético total
	<i>M. spicata</i>	0,26	Sinergético total
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	<i>M. pulegium</i>	0,53	Sinergético total
	<i>M. spicata</i>	0,53	Sinergético total
<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>M. pulegium</i>	0,81	Aditivo
	<i>M. spicata</i>	0,20	Sinergético total
<i>E. coli</i> LFG 1003	<i>M. pulegium</i>	1,13	Aditivo
	<i>M. spicata</i>	0,44	Sinergético total
<i>M. morgani</i> LFG 1008	<i>M. pulegium</i>	1,03	Aditivo
	<i>M. spicata</i>	1,73	Aditivo
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>M. pulegium</i>	0,75	Sinergético parcial
	<i>M. spicata</i>	0,51	Sinergético total
<i>P. aeruginosa</i> LFG 1002	<i>M. pulegium</i>	0,04	Sinergético total
	<i>M. spicata</i>	0,53	Sinergético total
<i>P. mirabilis</i> LFG 1004	<i>M. pulegium</i>	0,51	Sinergético total
	<i>M. spicata</i>	0,57	Sinergético parcial
<i>S. enteritidis</i> LFG 1005	<i>M. pulegium</i>	0,24	Sinergético total
	<i>M. spicata</i>	0,63	Sinergético parcial
<i>S. typhimurium</i> LFG 1006	<i>M. pulegium</i>	0,67	Sinergético parcial
	<i>M. spicata</i>	0,20	Sinergético total

Tabela 16 Valores de índice de concentração inibitória fracionada (FIC) e interação entre os óleos essenciais de *C. nepeta* e *O. vulgare*.

Microrganismo	FIC	Interação
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	0,36	Sinergético total
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0,50	Sinergético total
<i>S. aureus</i> LFG 1007	0,93	Aditivo
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	0,41	Sinergético total
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,64	Sinergético parcial
<i>E. coli</i> LFG 1003	1,27	Aditivo
<i>M. morgani</i> LFG 1008	0,95	Aditivo
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0,17	Sinergético total
<i>P. aeruginosa</i> LFG 1002	1,36	Aditivo
<i>P. mirabilis</i> LFG 1004	0,94	Aditivo
<i>S. enteritidis</i> LFG 1005	0,24	Sinergético total
<i>S. typhimurium</i> LFG 1006	0,20	Sinergético total

Tabela 17 Valores de índice de concentração inibitória fracionada (FIC) e interação entre os óleos essenciais de *L. pedunculata* e *L. viridis*.

Microrganismo	FIC	Interação
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	0,69	Sinergético parcial
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0,50	Sinergético total
<i>S. aureus</i> LFG 1007	0,38	Sinergético total
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	0,58	Sinergético parcial
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1,08	Aditivo
<i>E. coli</i> LFG 1003	0,71	Sinergético parcial
<i>M. morgani</i> LFG 08	1,00	Aditivo
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0,83	Aditivo
<i>P. aeruginosa</i> LFG 1002	0,18	Sinergético total
<i>P. mirabilis</i> LFG 1004	1,33	Aditivo
<i>S. enteritidis</i> LFG 1005	1,00	Aditivo
<i>S. typhimurium</i> LFG 1006	0,69	Sinergético parcial

Tabela 18 Valores de índice de concentração inibitória fracionada (FIC) e interação entre os óleos essenciais de gênero *Lavandula* e de gênero *Mentha*.

Microrganismo	Óleo essencial de <i>Lavandula</i>	Óleo essencial de <i>Mentha</i>	FIC	Interação
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>L. pedunculata</i>	<i>M. pulegium</i>	0,67	Sinergético parcial
	<i>L. pedunculata</i>	<i>M. spicata</i>	0,46	Sinergético total
	<i>L. viridis</i>	<i>M. spicata</i>	1,08	Aditivo
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>L. pedunculata</i>	<i>M. pulegium</i>	0,69	Sinergético parcial
	<i>L. pedunculata</i>	<i>M. spicata</i>	0,71	Sinergético parcial
	<i>L. viridis</i>	<i>M. spicata</i>	0,68	Sinergético parcial
<i>S. aureus</i> LFG 1007	<i>L. pedunculata</i>	<i>M. pulegium</i>	0,02	Sinergético total
	<i>L. pedunculata</i>	<i>M. spicata</i>	0,21	Sinergético total
	<i>L. viridis</i>	<i>M. spicata</i>	3,00	Aditivo
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	<i>L. pedunculata</i>	<i>M. pulegium</i>	0,35	Sinergético total
	<i>L. pedunculata</i>	<i>M. spicata</i>	0,35	Sinergético total
	<i>L. viridis</i>	<i>M. spicata</i>	1,00	Aditivo
<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>L. pedunculata</i>	<i>M. pulegium</i>	1,01	Aditivo
	<i>L. pedunculata</i>	<i>M. spicata</i>	0,83	Sinergético parcial
	<i>L. viridis</i>	<i>M. spicata</i>	1,25	Aditivo
<i>E. coli</i> LFG 1003	<i>L. pedunculata</i>	<i>M. pulegium</i>	0,51	Sinergético total
	<i>L. pedunculata</i>	<i>M. spicata</i>	0,70	Sinergético parcial
	<i>L. viridis</i>	<i>M. spicata</i>	1,00	Aditivo
<i>M. morgani</i> LFG 1008	<i>L. pedunculata</i>	<i>M. pulegium</i>	0,54	Sinergético total
	<i>L. pedunculata</i>	<i>M. spicata</i>	0,33	Sinergético total
	<i>L. viridis</i>	<i>M. spicata</i>	0,62	Sinergético parcial

Tabela 18 Valores de índice de concentração inibitória fracionada (FIC) e interação entre os óleos essenciais de género *Lavandula* e de género *Mentha* (continuação).

Microrganismo	Óleo essencial de <i>Lavandula</i>	Óleo essencial de <i>Mentha</i>	FIC	Interação
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>L. pedunculata</i>	<i>M. pulegium</i>	0,17	Sinergético total
	<i>L. pedunculata</i>	<i>M. spicata</i>	0,35	Sinergético total
<i>P. aeruginosa</i> LFG 1002	<i>L. pedunculata</i>	<i>M. pulegium</i>	0,03	Sinergético total
	<i>L. pedunculata</i>	<i>M. spicata</i>	0,08	Sinergético total
	<i>L. viridis</i>	<i>M. spicata</i>	0,03	Sinergético total
<i>P. mirabilis</i> LFG 1004	<i>L. pedunculata</i>	<i>M. pulegium</i>	0,54	Sinergético total
	<i>L. pedunculata</i>	<i>M. spicata</i>	0,54	Sinergético total
	<i>L. viridis</i>	<i>M. spicata</i>	0,83	Sinergético parcial
<i>S. enteritidis</i> LFG 1005	<i>L. pedunculata</i>	<i>M. pulegium</i>	0,67	Sinergético parcial
	<i>L. pedunculata</i>	<i>M. spicata</i>	0,54	Sinergético total
	<i>L. viridis</i>	<i>M. spicata</i>	1,00	Aditivo
<i>S. typhimurium</i> LFG 1006	<i>L. pedunculata</i>	<i>M. pulegium</i>	0,52	Sinergético total
	<i>L. pedunculata</i>	<i>M. spicata</i>	0,72	Sinergético parcial
	<i>L. viridis</i>	<i>M. spicata</i>	0,58	Sinergético parcial

Tabela 19 Valores de índice de concentração inibitória fracionada (FIC) e interação entre os óleos essenciais de género *Mentha*.

Microrganismo	FIC	Interação
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	0,92	Aditivo
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0,46	Sinergético total
<i>S. aureus</i> LFG 1007	0,08	Sinergético total
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	0,05	Sinergético total
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1,50	Aditivo
<i>E. coli</i> LFG 1003	1,00	Aditivo
<i>M. morgani</i> LFG 1008	0,26	Sinergético total
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0,06	Sinergético total
<i>P. aeruginosa</i> LFG 1002	0,10	Sinergético total
<i>P. mirabilis</i> LFG 1004	2,00	Aditivo
<i>S. enteritidis</i> LFG 1005	0,34	Sinergético total
<i>S. typhimurium</i> LFG 1006	0,42	Sinergético total

II. Avaliação do potencial bactericida das misturas

Tabela 20 Valores de concentração mínima bactericida (CMB), representados em µL/mL, obtidos para as misturas do OE de *C. nepeta* com OEs de género *Lavandula* face às estirpes bacterianas testadas.

	CMB (µL/mL)					
	<i>C. nepeta/L. luisieri</i>		<i>C. nepeta/L. pedunculata</i>		<i>C. nepeta/L. viridis</i>	
	[<i>C. nepeta</i>]	[<i>L. luisieri</i>]	[<i>C. nepeta</i>]	[<i>L. pedunculata</i>]	[<i>C. nepeta</i>]	[<i>L. viridis</i>]
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	> 3,0	> 3,0	2,0	1,0	2,0	3,0
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	3,0	1,0	3,0	3,0	2,0	3,0
<i>S. aureus</i> LFG 1007	n.d.	n.d.	> 4,0	> 4,0	> 3,0	> 3,0
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	1,0	3,0	3,0	3,0	n.d.	n.d.
<i>E. coli</i> ATCC 25922	> 3,0	> 3,0	2,0	0,03	n.d.	n.d.
<i>E. coli</i> LFG 1003	> 3,0	> 3,0	3,0	3,0	n.d.	n.d.
<i>M. morgani</i> LFG 1008	> 3,0	> 3,0	> 4,0	> 4,0	n.d.	n.d.
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	n.d.	n.d.	> 4,0	> 4,0	n.d.	n.d.
<i>P. aeruginosa</i> LFG 1002	n.d.	n.d.	1,5	3,0	3,0	3,0
<i>P. mirabilis</i> LFG 1004	> 3,0	> 3,0	> 4,0	> 4,0	n.d.	n.d.
<i>S. enteritidis</i> LFG 1005	> 3,0	> 3,0	0,125	2,0	n.d.	n.d.
<i>S. typhimurium</i> LFG 1006	> 3,0	> 3,0	> 4,0	> 4,0	n.d.	n.d.

Legenda: n.d. – não determinado.

Tabela 21 Valores de concentração mínima bactericida (CMB), representados em $\mu\text{L/mL}$, obtidos para as misturas do OE de *C. nepeta* com OEs de género *Mentha* face às estirpes bacterianas testadas.

	CMB ($\mu\text{L/mL}$)			
	<i>C. nepeta/M. pulegium</i>		<i>C. nepeta/M. spicata</i>	
	[<i>C. nepeta</i>]	[<i>M. pulegium</i>]	[<i>C. nepeta</i>]	[<i>M. spicata</i>]
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	> 3,0	> 3,0	2,0	2,0
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	2,0	0,5	> 4,0	> 4,0
<i>S. aureus</i> LFG 1007	0,03	4,0	3,0	3,0
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	0,03	4,0	4,0	4,0
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,5	2,0	0,5	0,25
<i>E. coli</i> LFG 1003	0,5	4,0	2,0	0,125
<i>M. morgani</i> LFG 08	> 4,0	> 4,0	> 4,0	> 4,0
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	> 4,0	> 4,0	> 4,0	> 4,0
<i>P. aeruginosa</i> LFG 1002	0,02	2,0	4,0	4,0
<i>P. mirabilis</i> LFG 1004	> 4,0	> 4,0	4,0	4,0
<i>S. enteritidis</i> LFG 1005	0,5	2,0	0,5	4,0
<i>S. typhimurium</i> LFG 1006	> 4,0	> 4,0	> 4,0	> 4,0

Tabela 22 Valores de concentração mínima bactericida (CMB), representados em $\mu\text{L/mL}$, obtidos para a mistura do OE de *C. nepeta* com o OE de *O. vulgare* face às estirpes bacterianas testadas.

	CMB ($\mu\text{L/mL}$)	
	[<i>C. nepeta</i>]	[<i>O. vulgare</i>]
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	> 4,0	> 4,0
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	4,0	1,0
<i>S. aureus</i> LFG 1007	> 4,0	> 4,0
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	4,0	2,0
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,03	4,0
<i>E. coli</i> LFG 1003	4,0	0,03
<i>M. morgani</i> LFG 1008	> 4,0	> 4,0
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	> 4,0	> 4,0
<i>P. aeruginosa</i> LFG 1002	> 4,0	> 4,0
<i>P. mirabilis</i> LFG 1004	> 4,0	> 4,0
<i>S. enteritidis</i> LFG 1005	4,0	0,5
<i>S. typhimurium</i> LFG 1006	> 4,0	> 4,0

Tabela 23 Valores de concentração mínima bactericida (CMB), representados em $\mu\text{L/mL}$, obtidos para a mistura do OE de *L. pedunculata* com o OE de *L. viridis* face às estirpes bacterianas testadas.

	CMB ($\mu\text{L/mL}$)	
	[<i>L. pedunculata</i>]	[<i>L. viridis</i>]
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	> 3	> 3
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	3,0	2,0
<i>S. aureus</i> LFG 1007	> 3	> 3
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	3,0	3,0
<i>E. coli</i> ATCC 25922	> 3	> 3
<i>E. coli</i> LFG 1003	> 3	> 3
<i>M. morgani</i> LFG 1008	> 3	> 3
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0,5	1,5
<i>P. aeruginosa</i> LFG 1002	3,0	1,0
<i>P. mirabilis</i> LFG 1004	> 3	> 3
<i>S. enteritidis</i> LFG 1005	> 3	> 3
<i>S. typhimurium</i> LFG 1006	> 3	> 3

Tabela 24 Valores de concentração mínima bactericida (CMB), representados em $\mu\text{L/mL}$, obtidos para a mistura de OEs de género *Lavandula* com OEs de género *Mentha* face às estirpes bacterianas testadas.

	CMB ($\mu\text{L/mL}$)					
	<i>L. pedunculata/M. pulegium</i>		<i>L. pedunculata/M. spicata</i>		<i>L. viridis/M. spicata</i>	
	[<i>L. pedunculata</i>]	[<i>M. pulegium</i>]	[<i>L. pedunculata</i>]	[<i>M. spicata</i>]	[<i>L. viridis</i>]	[<i>M. spicata</i>]
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	> 4,0	> 4,0	3,0	1,5	> 3,0	> 3,0
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0,03	4,0	1,5	3,0	1,0	3,0
<i>S. aureus</i> LFG 1007	> 4,0	> 4,0	> 3,0	> 3,0	> 3,0	> 3,0
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	2,0	4,0	0,5	1,5	3,0	2,0
<i>E. coli</i> ATCC 25922	2,0	2,0	> 3,0	> 3,0	> 3,0	> 3,0
<i>E. coli</i> LFG 1003	> 3,0	> 3,0	3,0	2,0	3,0	1,0
<i>M. morgani</i> LFG 1008	> 3,0	> 3,0	> 3,0	> 3,0	> 3,0	> 3,0
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	> 3,0	> 3,0	> 3,0	> 3,0	n.d.	n.d.
<i>P. aeruginosa</i> LFG 1002	1,5	0,06	1,5	0,06	> 3,0	> 3,0
<i>P. mirabilis</i> LFG 1004	> 3,0	> 3,0	3,0	3,0	> 3,0	> 3,0
<i>S. enteritidis</i> LFG 1005	> 3,0	> 3,0	3,0	1,5	> 3,0	> 3,0
<i>S. typhimurium</i> LFG 1006	> 3,0	> 3,0	3,0	3,0	3,0	2,0

Legenda: n.d. – não determinado.

Tabela 25 Valores de concentração mínima bactericida (CMB), representados em $\mu\text{L/mL}$, obtidos para a mistura de OEs de género *Mentha* face às estirpes bacterianas testadas.

	CMB ($\mu\text{L/mL}$)	
	[<i>M. pulegium</i>]	[<i>M. spicata</i>]
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	3,0	2,0
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0,25	4,0
<i>S. aureus</i> LFG 1007	4,0	2,0
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	4,0	1,0
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,02	4,0
<i>E. coli</i> LFG 1003	4,0	0,5
<i>M. morgani</i> LFG 1008	> 4,0	> 4,0
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0,06	2,0
<i>P. aeruginosa</i> LFG 1002	4,0	0,5
<i>P. mirabilis</i> LFG 1004	4,0	2,0
<i>S. enteritidis</i> LFG 1005	2,0	2,0
<i>S. typhimurium</i> LFG 1006	> 4,0	> 4,0

III. Avaliação da viabilidade celular

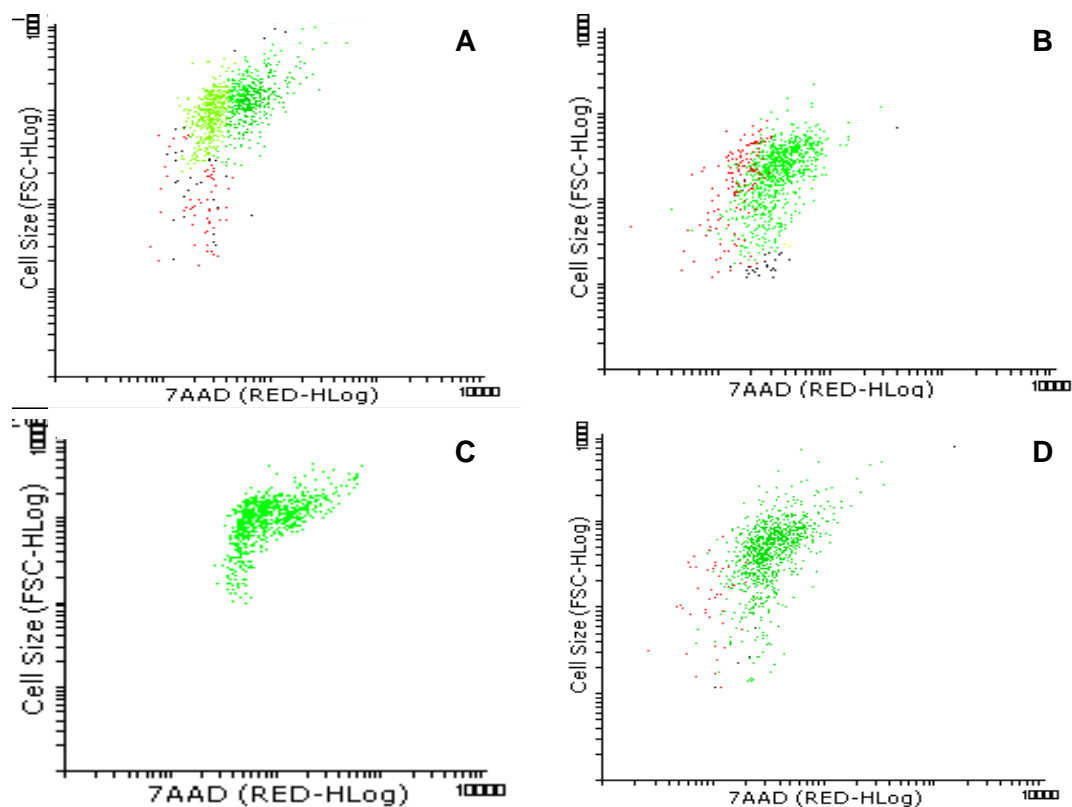


Figura 20 Determinação do controlo positivo, em ensaio de citometria de fluxo, recorrendo ao tamanho celular da amostra. As zonas a verde representam a população bacteriana em estudo, enquanto as zonas a vermelho representam a população contaminante. A – Controlo positivo de *E. faecalis* ATCC 29212; B – Controlo positivo de *S. aureus* LFG 1007; C – Controlo positivo de *E. coli* LFG 1003; D – Controlo positivo de *P. aeruginosa* LFG 1002.

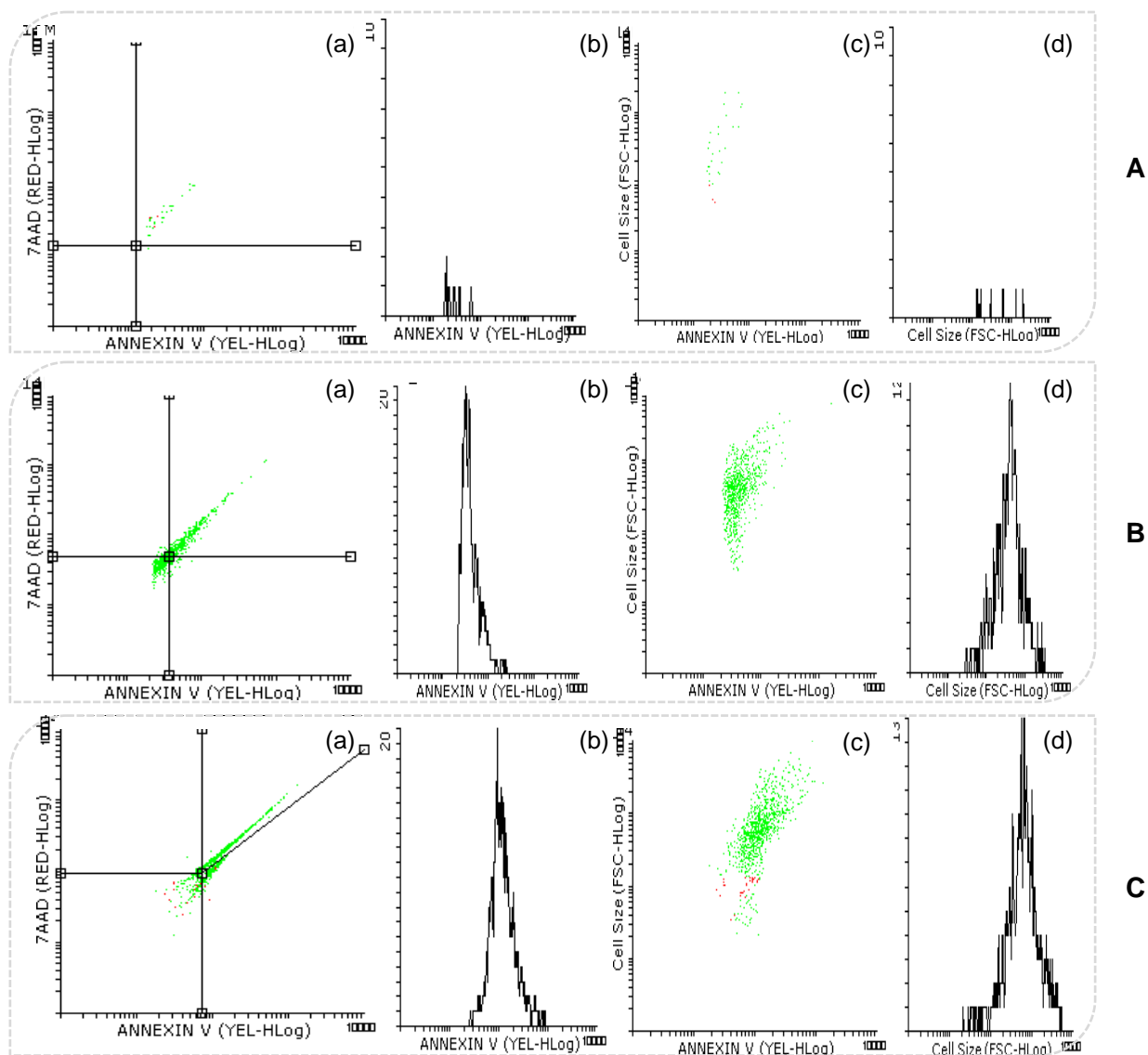


Figura 21 Avaliação da viabilidade celular em citometria de fluxo da mistura *C. nepeta/L. pedunculata* face à estirpe *E. faecalis* ATCC 29212. A – Concentração 3,0 µL/mL de *C. nepeta* e 3,0 µL/mL de *L. pedunculata*; B – Concentração 1,0 µL/mL de *C. nepeta* e 1,0 µL/mL de *L. pedunculata*; C – Concentração 1,0 µL/mL de *C. nepeta* e 0,06 µL/mL de *L. pedunculata*; (a) – gráfico de dispersão segundo a viabilidade celular; (b) – histograma segundo a viabilidade celular; (c) – gráfico de dispersão segundo o tamanho celular; (d) – histograma relativo ao tamanho celular.

Tabela 26 Avaliação da viabilidade celular da mistura *C. nepeta/L. pedunculata*, face à estirpe *E. faecalis* ATCC 29212.

[<i>C. nepeta</i>]/[<i>L. pedunculata</i>] (µL/mL)	Células viáveis (%)	Células em início de apoptose (%)	Células apoptóticas (%)
3,0/3,0	0	3,4	96,6
1,0/1,0	55,8	11,6	31,2
1,0/0,06	14,2	23,7	59,2

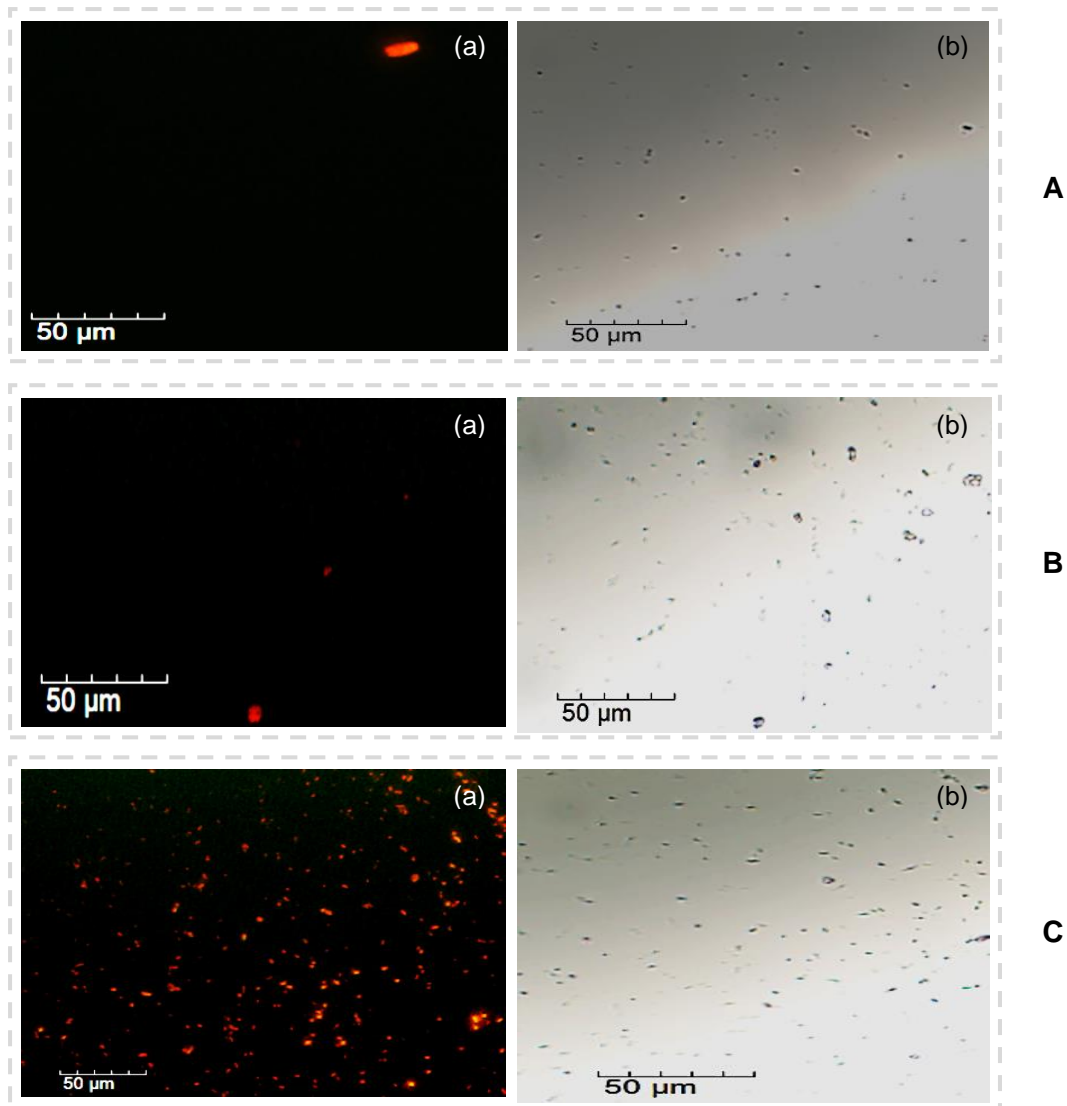


Figura 22 Avaliação da viabilidade celular em microscopia de epifluorescência da mistura *C. nepeta*/*L. pedunculata* face à estirpe *E. faecalis* ATCC 29212. A – Controlo positivo; B – Concentração 1,0 µL/mL de *C. nepeta* e 1,0 µL/mL de *L. pedunculata*; C – Concentração 1,0 µL/mL de *C. nepeta* e 0,06 µL/mL de *L. pedunculata*; (a) – células em fluorescência, utilizando PI como fluorocromo (b) – células não submetidas a radiação fluorescente.

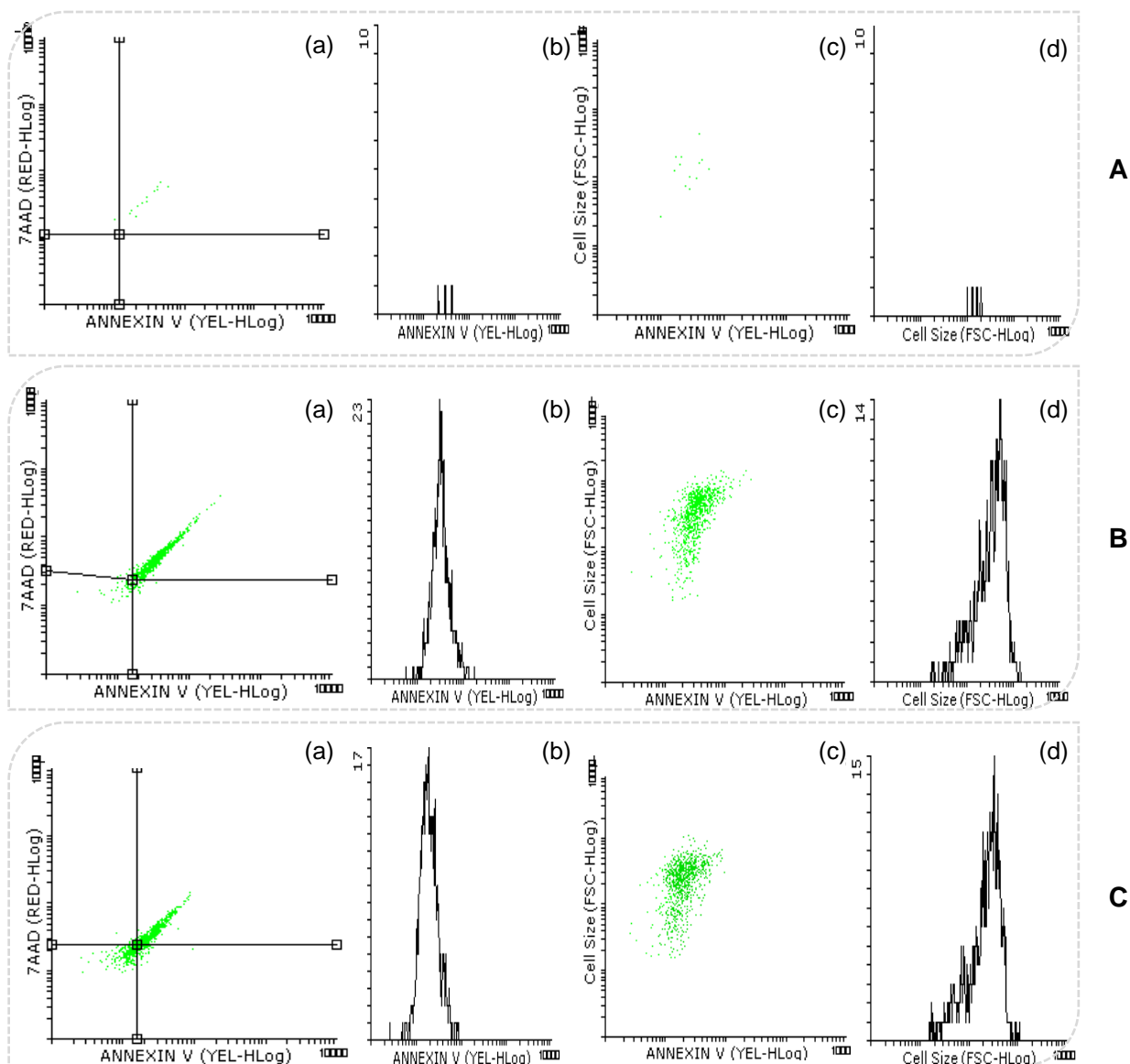


Figura 23 Avaliação da viabilidade celular em citometria de fluxo da mistura *C. nepeta*/*L. pedunculata* face à estirpe *S. aureus* LFG 1007. A – Concentração 3,0 µL/mL de *C. nepeta* e 3,0 µL/mL de *L. pedunculata*; B – Concentração 1,0 µL/mL de *C. nepeta* e 1,0 µL/mL de *L. pedunculata*; C – Concentração 1,0 µL/mL de *C. nepeta* e 0,06 µL/mL de *L. pedunculata*; (a) – gráfico de dispersão segundo a viabilidade celular; (b) – histograma segundo a viabilidade celular; (c) – gráfico de dispersão segundo o tamanho celular; (d) – histograma relativo ao tamanho celular.

Tabela 27 Avaliação da viabilidade celular da mistura *C. nepeta*/*L. pedunculata*, face à estirpe *S. aureus* LFG 1007.

[<i>C. nepeta</i>]/[<i>L. pedunculata</i>] (µL/mL)	Células viáveis (%)	Células em início de apoptose (%)	Células apoptóticas (%)
3,0/3,0	0	0	92,3
1,0/1,0	4,9	3,4	90,7
1,0/0,06	29,1	13,1	54,2

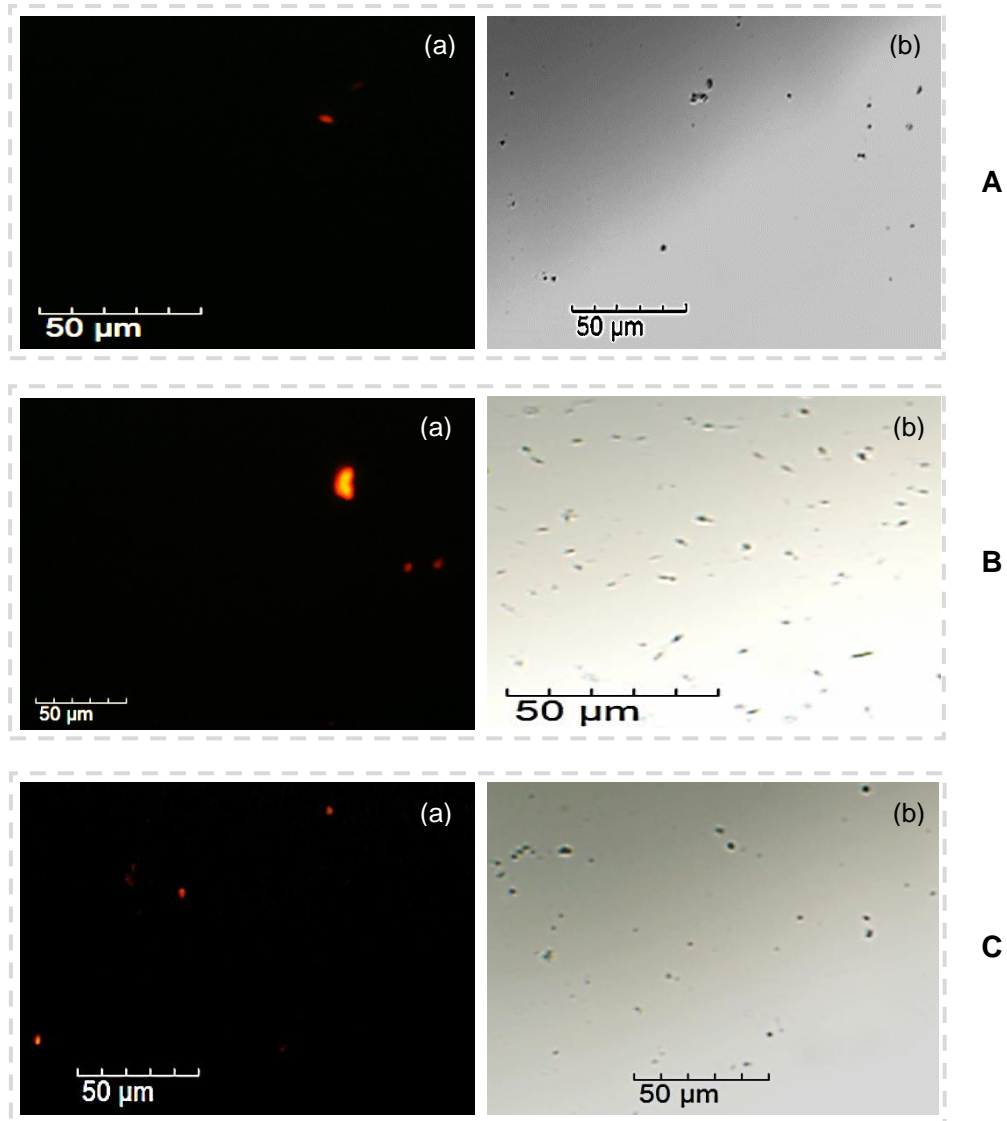


Figura 24 Avaliação da viabilidade celular em microscopia de epifluorescência da mistura *C. nepeta*/*L. pedunculata* face à estirpe *S. aureus* LFG 1007. A – Controlo positivo; B – Concentração 3,0 µL/mL de *C. nepeta* e 3,0 µL/mL de *L. pedunculata*; C – Concentração 1,0 µL/mL de *C. nepeta* e 0,06 µL/mL de *L. pedunculata*; (a) – células em fluorescência, utilizando PI como fluorocromo (b) – células não submetidas a radiação fluorescente.

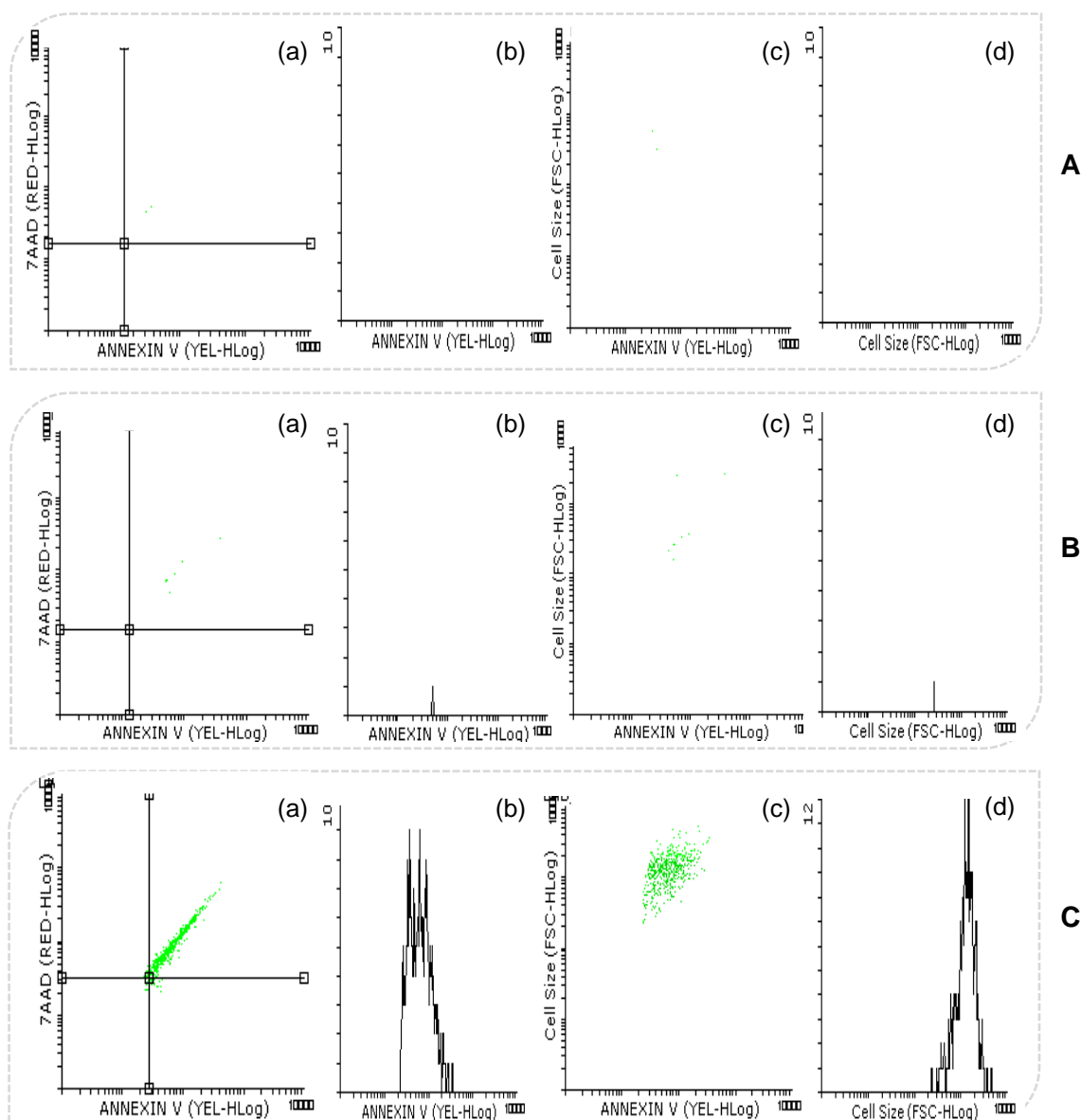


Figura 25 Avaliação da viabilidade celular em citometria de fluxo da mistura *C. nepeta*/*L. pedunculata* face à estirpe *E. coli* LFG 1003. A – Concentração 3,0 $\mu\text{L/mL}$ de *C. nepeta* e 3,0 $\mu\text{L/mL}$ de *L. pedunculata*; B – Concentração 1,5 $\mu\text{L/mL}$ de *C. nepeta* e 1,5 $\mu\text{L/mL}$ de *L. pedunculata*; C – Concentração 0,5 $\mu\text{L/mL}$ de *C. nepeta* e 1,5 $\mu\text{L/mL}$ de *L. pedunculata*; (a) – gráfico de dispersão segundo a viabilidade celular; (b) – histograma segundo a viabilidade celular; (c) – gráfico de dispersão segundo o tamanho celular; (d) – histograma relativo ao tamanho celular.

Tabela 28 Avaliação da viabilidade celular da mistura *C. nepeta*/*L. pedunculata*, face à estirpe *E. coli* LFG 1003.

[<i>C. nepeta</i>]/[<i>L. pedunculata</i>] ($\mu\text{L/mL}$)	Células viáveis (%)	Células em início de apoptose (%)	Células apoptóticas (%)
3,0/3,0	0	0	100
1,5/1,5	0	0	100
0,5/1,5	3,1	4,0	90,7

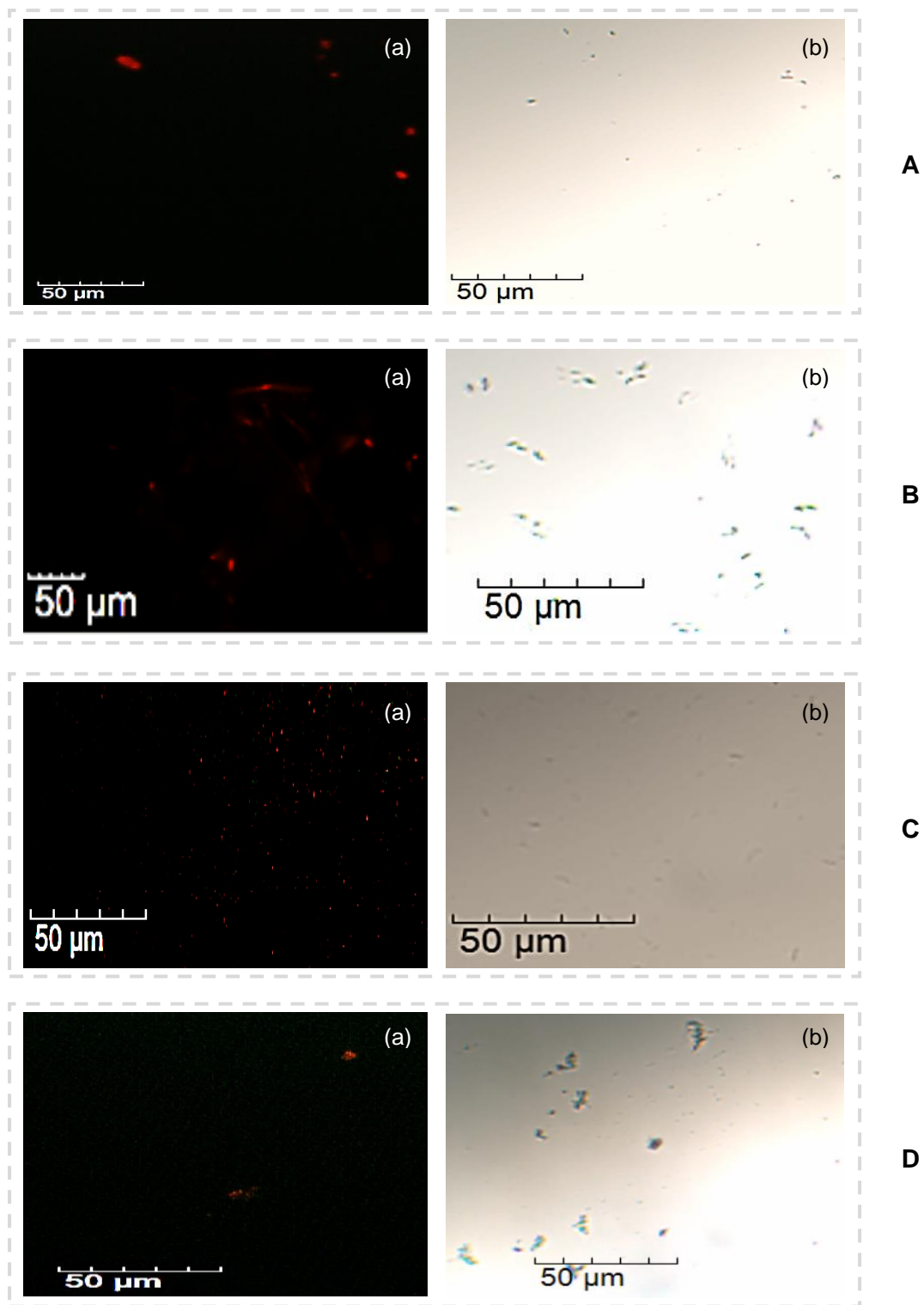


Figura 26 Avaliação da viabilidade celular em microscopia de epifluorescência da mistura *C. nepeta*/*L. pedunculata* face à estirpe *E. coli* LFG 1003. A – Controlo positivo em tubo; B – Controlo positivo em microplaca; C – Concentração 3,0 µL/mL de *C. nepeta* e 3,0 µL/mL de *L. pedunculata*; D – Concentração 1,0 µL/mL de *C. nepeta* e 0,06 µL/mL de *L. pedunculata*; (a) – células em fluorescência, utilizando PI como fluorocromo (b) – células não submetidas a radiação fluorescente.

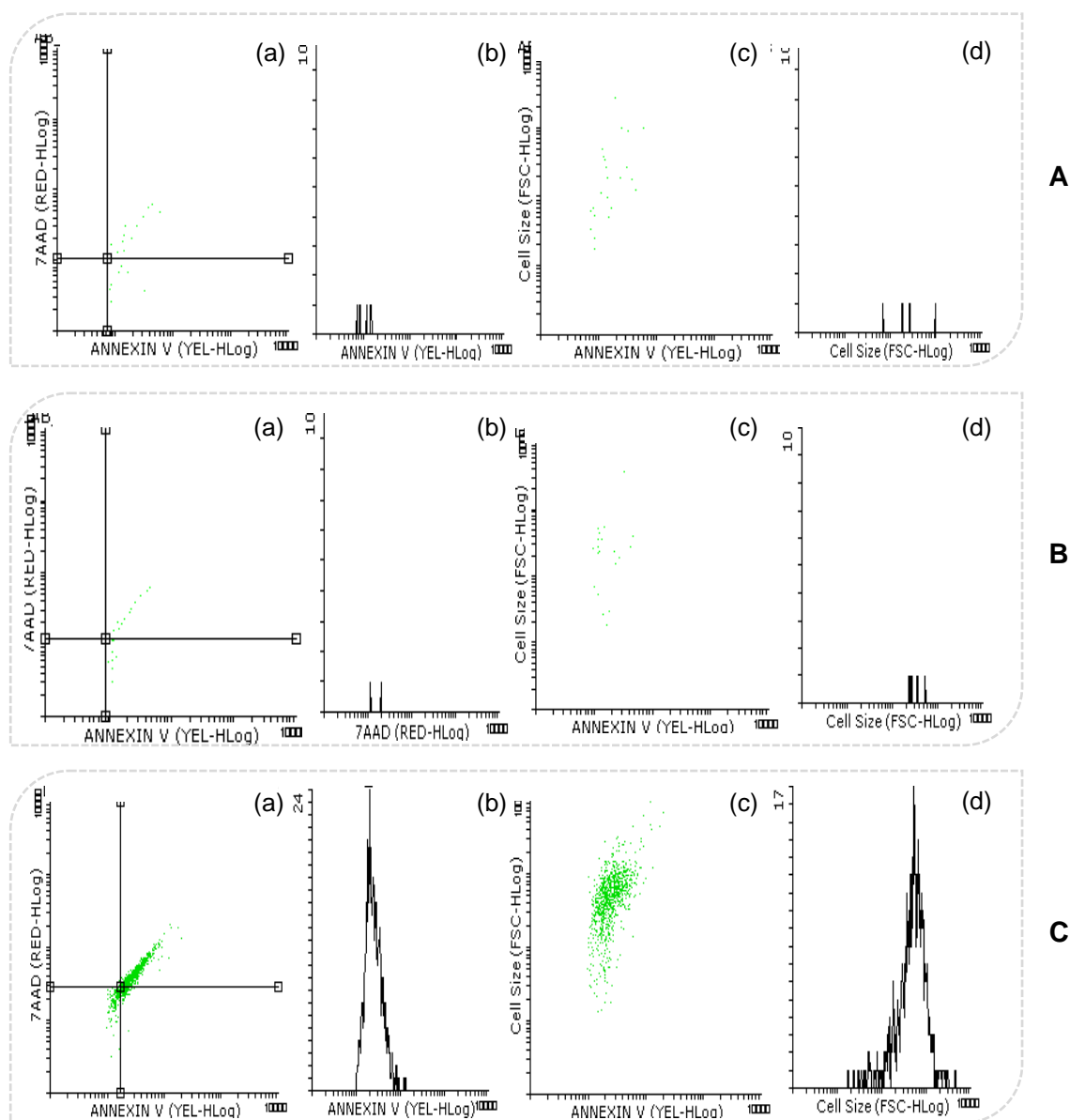


Figura 27 Avaliação da viabilidade celular em citometria de fluxo da mistura *C. nepeta*/*L. pedunculata* face à estirpe *P. aeruginosa* LFG 1002. A – Concentração 3,0 μL/mL de *C. nepeta* e 3,0 μL/mL de *L. pedunculata*; B – Concentração 1,0 μL/mL de *C. nepeta* e 1,0 μL/mL de *L. pedunculata*; C – Concentração 0,25 μL/mL de *C. nepeta* e 0,5 μL/mL de *L. pedunculata*; (a) – gráfico de dispersão segundo a viabilidade celular; (b) – histograma segundo a viabilidade celular; (c) – gráfico de dispersão segundo o tamanho celular; (d) – histograma relativo ao tamanho celular.

Tabela 29 Avaliação da viabilidade celular da mistura *C. nepeta*/*L. pedunculata*, face à estirpe *P. aeruginosa* LFG 1002.

[<i>C. nepeta</i>]/[<i>L. pedunculata</i>] (μL/mL)	Células viáveis (%)	Células em início de apoptose (%)	Células apoptóticas (%)
3,0/3,0	0	43,5	56,5
1,0/1,0	0	45,0	55,0
0,25/0,5	17,0	18,5	64,1

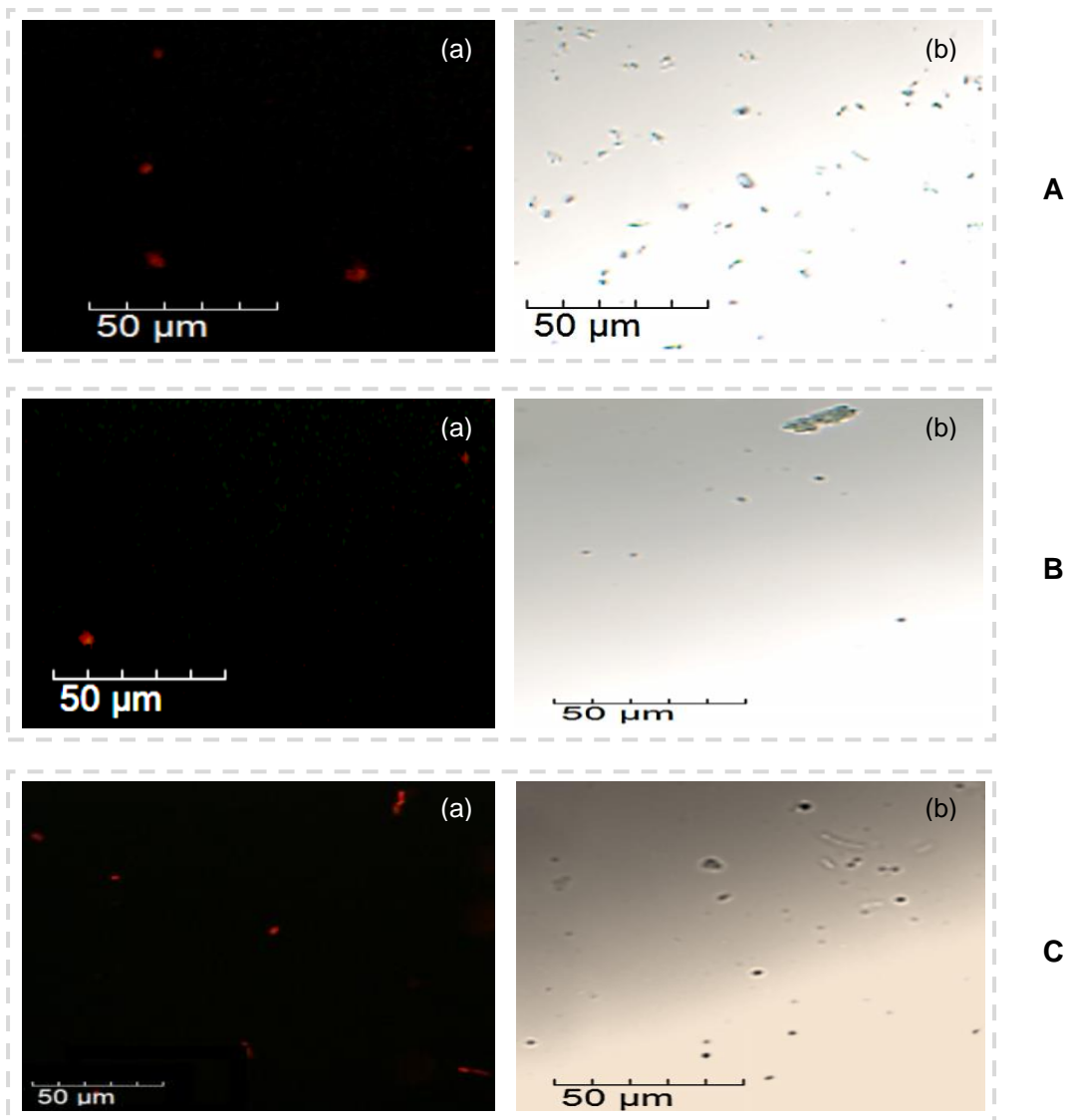


Figura 28 Avaliação da viabilidade celular em microscopia de epifluorescência da mistura *C. nepeta*/*L. pedunculata* face à estirpe *P. aeruginosa* LFG 1002. A – Controlo positivo em tubo; B – Concentração 3,0 µL/mL de *C. nepeta* e 3,0 µL/mL de *L. pedunculata*; C – Concentração 0,25 µL/mL de *C. nepeta* e 0,5 µL/mL de *L. pedunculata*; (a) – células em fluorescência, utilizando PI como fluorocromo (b) – células não submetidas a radiação fluorescente.

IV Avaliação da toxicidade em *Artemia salina*

Tabela 30 Valores de CL₅₀ obtidos para os óleos essenciais e o controlo positivo nos ensaios de letalidade de *Artemia Salina*.

Óleos essenciais/Padrão	CL ₅₀ (µg/mL)
<i>C. nepeta</i>	213,6 ± 2,0
<i>L. luisieri</i>	208,6 ± 4,3
<i>L. pedunculata</i>	213,2 ± 3,2
<i>L. viridis</i>	191,6 ± 1,6
<i>M. pulegium</i>	134,7 ± 6,7
<i>M. spicata</i>	192,0 ± 2,4
<i>O. vulgare</i>	35,0 ± 1,7
K ₂ CrO ₇	25,3 ± 0,9