



PROJECTO AGRO Nº 800 – REDE NACIONAL PARA A CONSERVAÇÃO E UTILIZAÇÃO DE PLANTAS AROMÁTICAS E MEDICINAIS

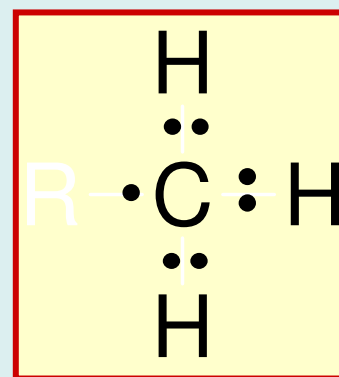
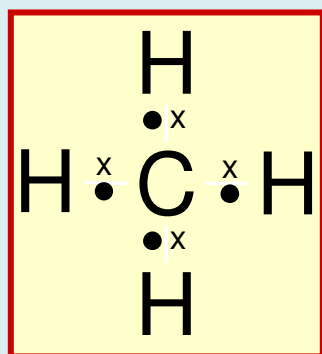
Estudo das Actividades Biológicas: Microbiana e Anti-oxidante

1. Oxidação: é a reacção em que um corpo ou uma espécie química perde um ou vários electrões:
 - $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{e}^-$
2. Redução: é a reacção em que um corpo ou uma espécie química aceita electrões.
 - $\text{O}_2 + 4\text{e}^- \rightarrow 2\text{O}^{2-}$
3. Oxidação é a reacção em que um composto se combina com um ou vários átomos de oxigénio
 - $4\text{Fe} + 3\text{O}_2 \rightarrow 2\text{Fe}_2\text{O}_3$



O que são radicais livres?

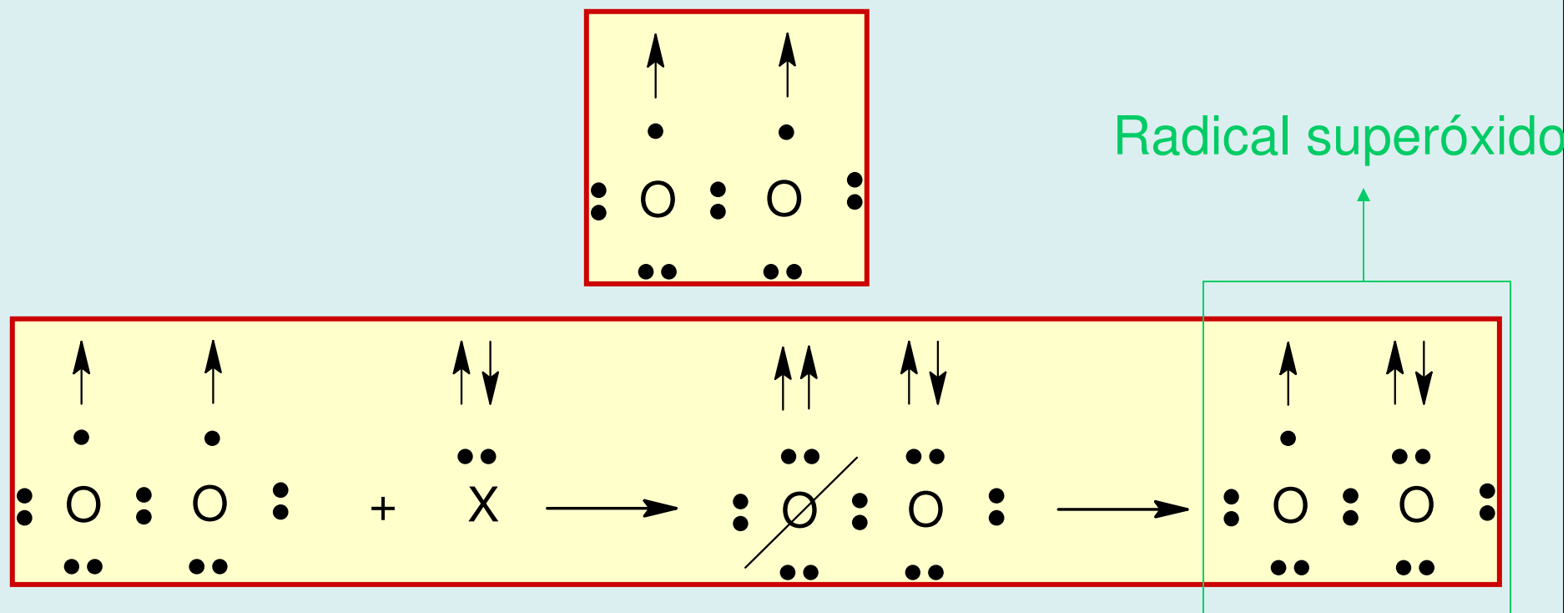
São fragmentos moleculares com um electrão desemparelhado na orbital de valência



É só o átomo de carbono que pode formar radicais livres?

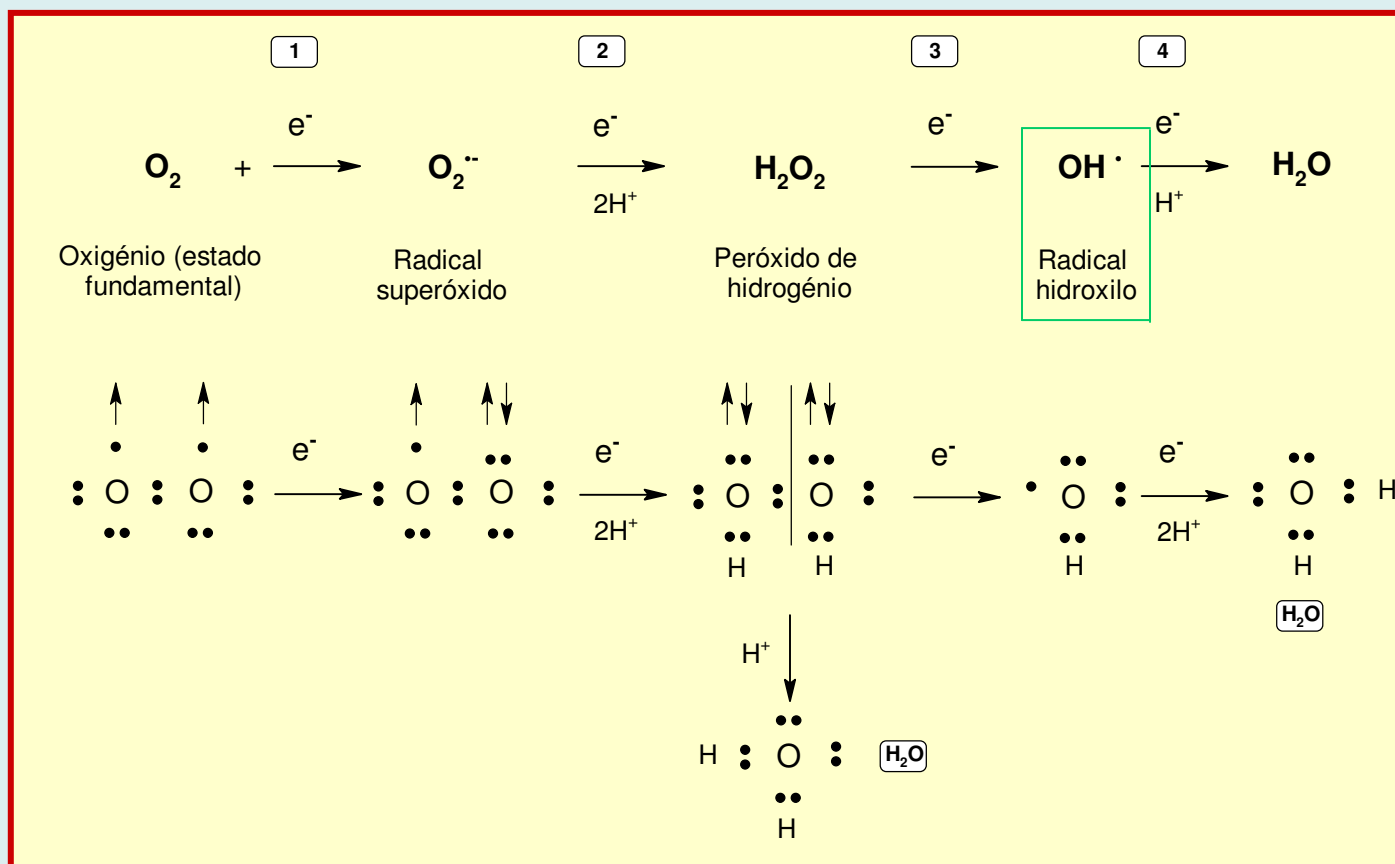
- Oxigénio
- Azoto
- Enxofre
- Muitos outros

Os seres humanos dependentes do oxigénio para a sua sobrevivência correm sempre o risco de sofrerem danos devido à formação de radicais livres. Porquê?



Princípio de Pauli: apenas os electrões com spin opostos podem formar um par de electrões.

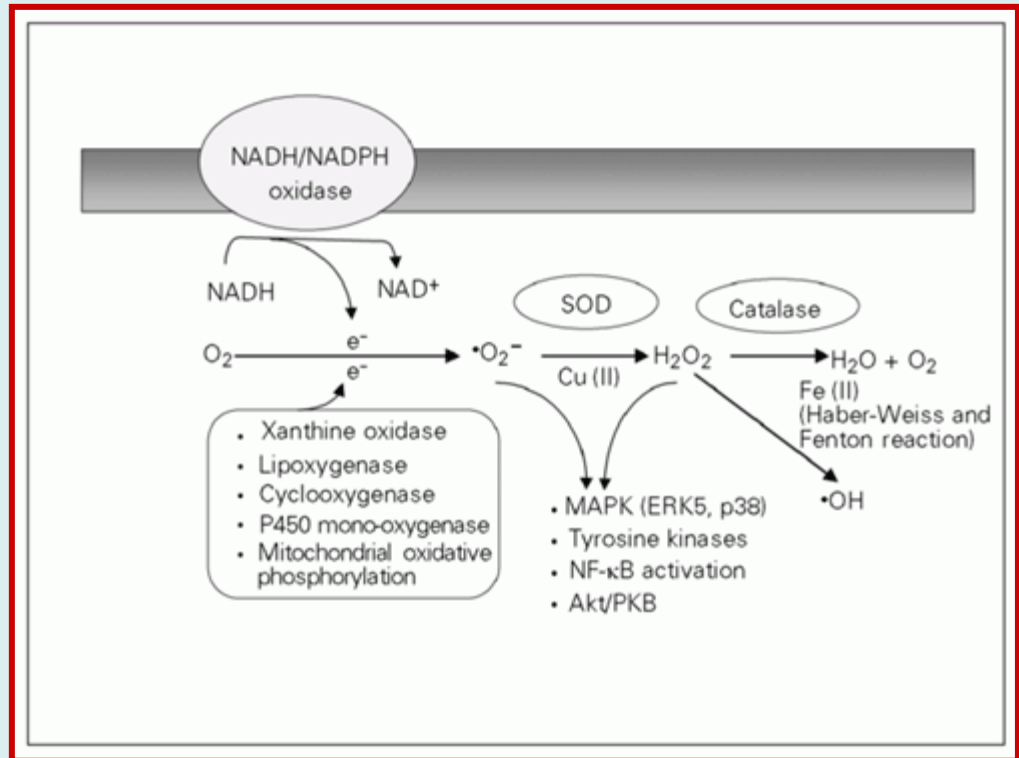
Há outros radicais oxigenados?



A produção de radicais hidroxilo é responsável por danos importantes nos sistemas biológicos porque este radical é um dos mais reactivos, atacando e danificando quase todas as moléculas dos seres vivos.

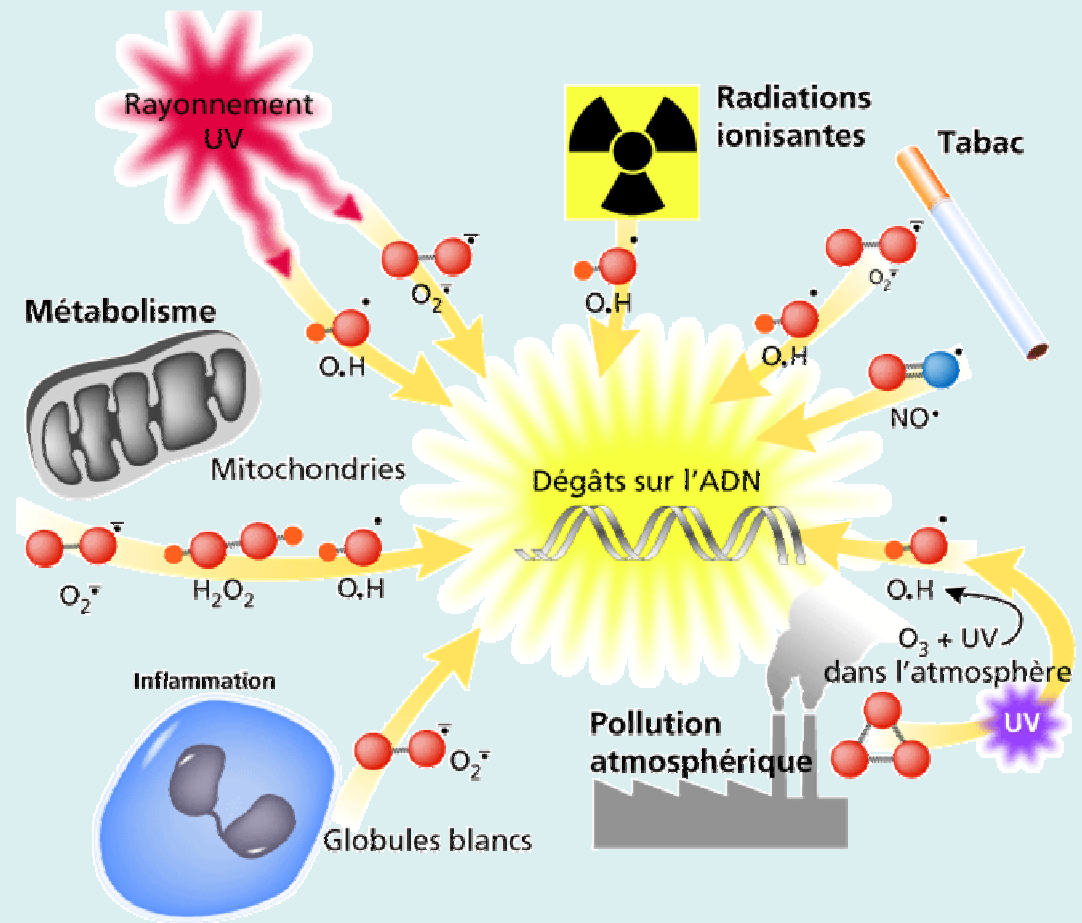
Principais fontes endógenas de espécies reativas oxigenadas

1. NADPH oxidase
2. Cadeia respiratória mitocondrial
3. Peroxissomas
4. Citocromo P450
5. Xantina oxidase
6. Ciclo-oxigenases
7. Lipo-oxigenases



Principais fontes exógenas de espécies reativas oxigenadas

1. Tóxicos ambientais
2. Radiações ionizantes
3. Radiações UV
4. Campos eléctricos
5. Xenobióticos pró-oxidantes
6. Citocinas pró-inflamatórias



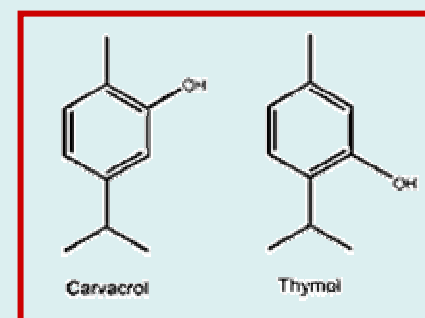
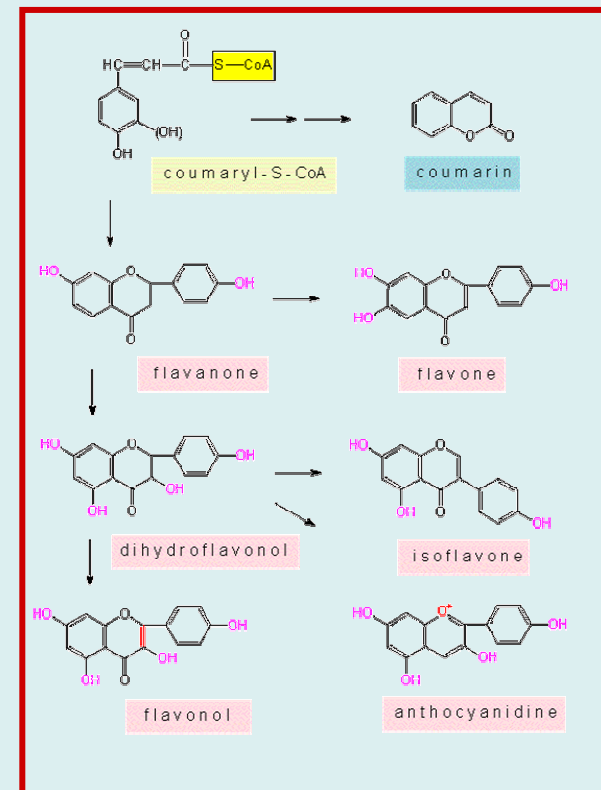
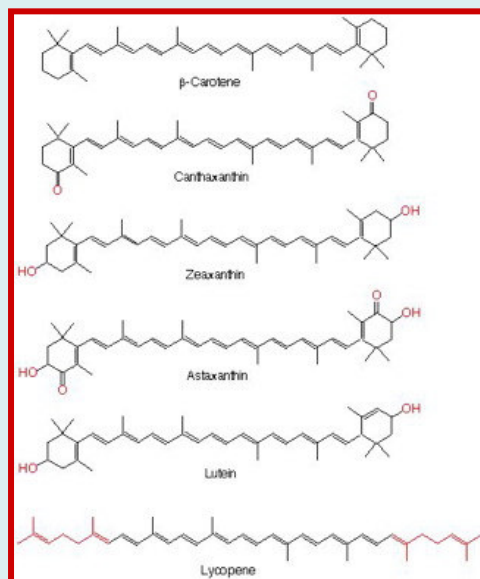
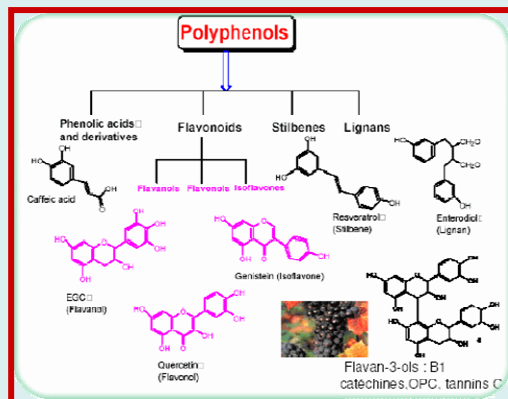
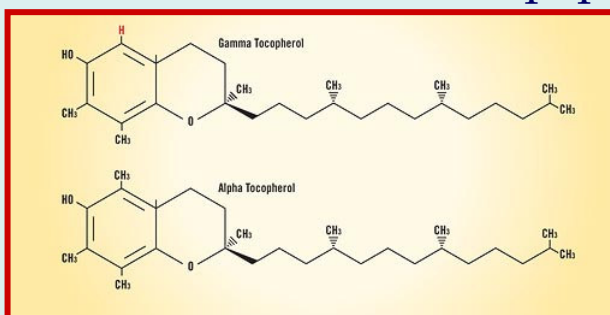
Antioxidante: substância que, quando presente em concentrações pequenas comparativamente às do substrato oxidável, impede ou atrasa significativamente a oxidação do substrato.

Antioxidante pode ser, então:

1. Substância capaz de inibir uma enzima oxidante específica
2. Substância capaz de reagir com agentes oxidantes antes que estes danifiquem outras moléculas
3. Substância capaz de formar complexos com iões metálicos perniciosos
4. Substância capaz de reparar sistemas como as proteínas transportadoras de ferro

NÃO EXISTE UM ANTIOXIDANTE UNIVERSAL

A alimentação tem um papel primordial para prevenir a produção de radicais livres



Avaliação antioxidante

1. Quantificação e identificação dos compostos fenólicos
2. Quantificação da capacidade de desactivar radicais
3. Quantificação da capacidade para inibir ou parar a oxidação lipídica



Mecanismos de desactivação de radicais

1. Transferência de átomos de hidrogénio ($X^\bullet + AH \rightarrow XH + A^\bullet$) e/
2. ou transferência de um electrão ($X^\bullet + AH \rightarrow X^- + AH^{\bullet+}$)



Métodos que se baseiam na transferência de um electrão

1. Quantificação de fenóis totais pelo método Folin-Ciocalteu
2. Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) ou método ABTS
3. Método DMPD (N,N-dimethyl-p-phenylenediamine)
4. Ferric ion reducing antioxidant power (FRAP)
5. Método de capacidade de redução do Cu(II)
6. Método do DPPH• (2,2-defenil-1-picril-hidrazilo)



Quantificação da capacidade para inibir ou parar a oxidação lipídica

1. Quantificação do desaparecimento de reagentes
 - Medição do consumo de oxigénio
 - Doseamento dos ácidos gordos não oxidados
2. Quantificação da formação de produtos primários
 - Medição do índice de peróxidos
3. Quantificação da formação de produtos secundários
 - Análise de compostos aldeídicos
 - Dosagem de compostos voláteis



Em qualquer dos casos, está sempre presente um substrato lipídico



Origanum vulgare



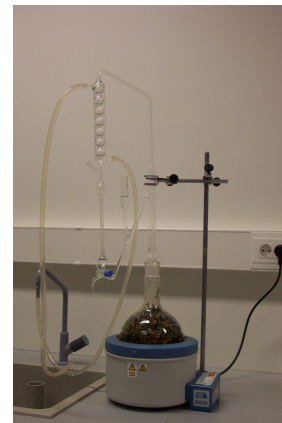
Thymus mastichina



Calamintha baetica



Thymbra capitata

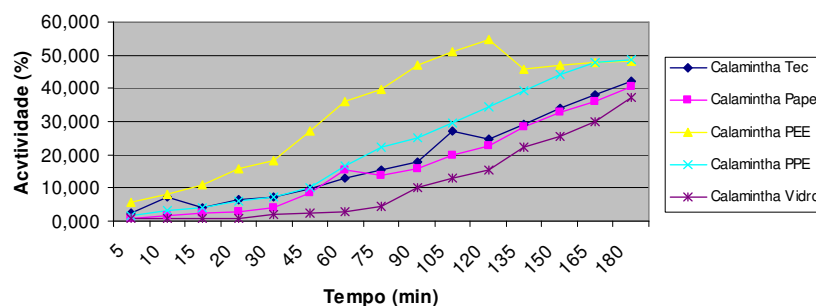


DPPH

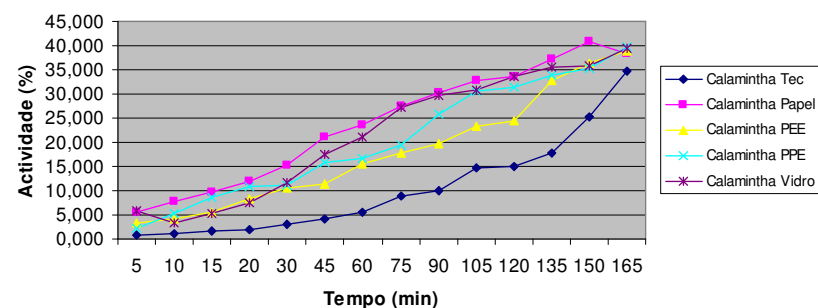
Calamintha baetica

Conc.=2336mg/L

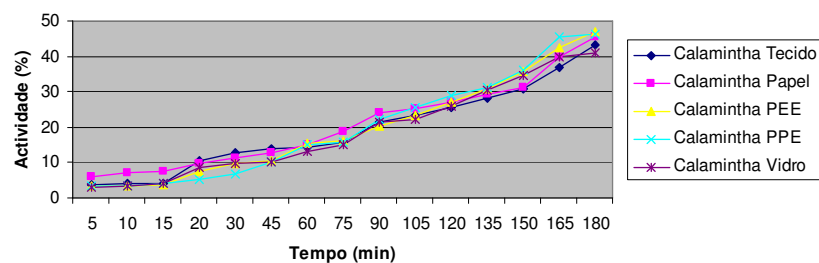
DPPH 1ª colheita (12 m)



DPPH 1ª colheita (18 m)



DPPH 2ª colheita (6 m)

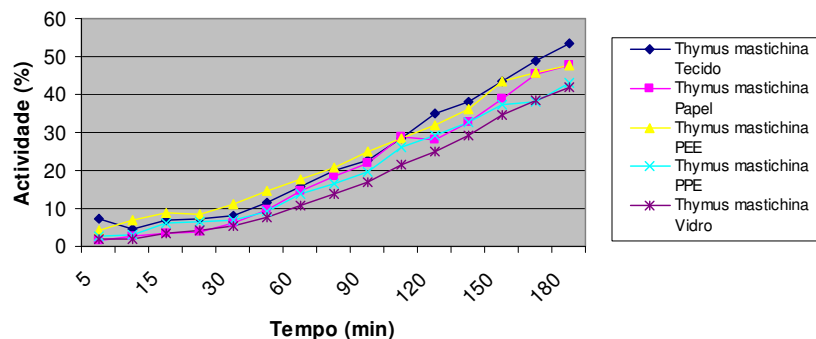


- Raramente a actividade atinge 50% (actividade moderada)
- Difícil estabelecer uma relação embalagem - actividade

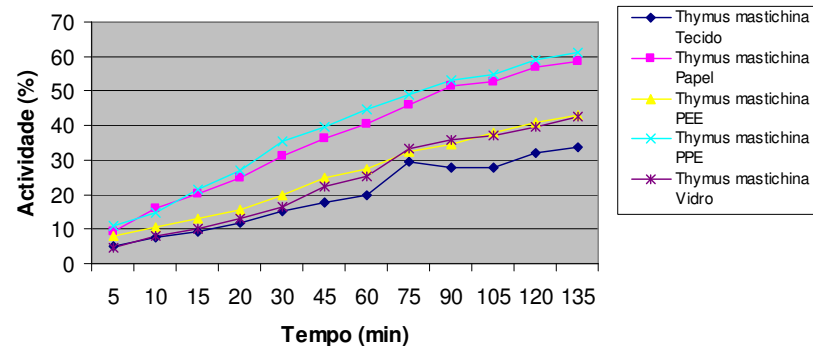
Thymus mastichina

Conc.=2352mg/L

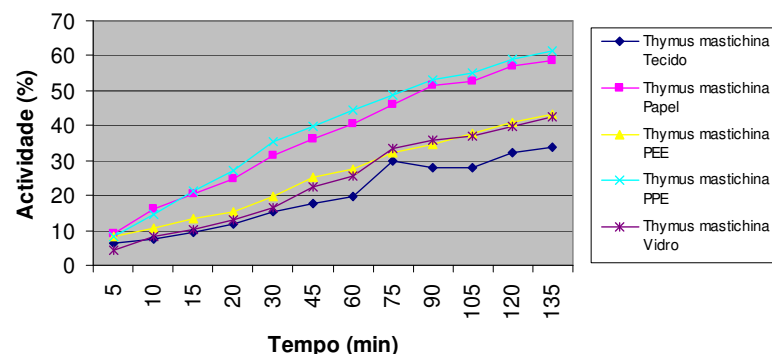
DPPH 1ª colheita (12 m)



DPPH 1ª colheita (18 m)



DPPH 2ª colheita (6 m)

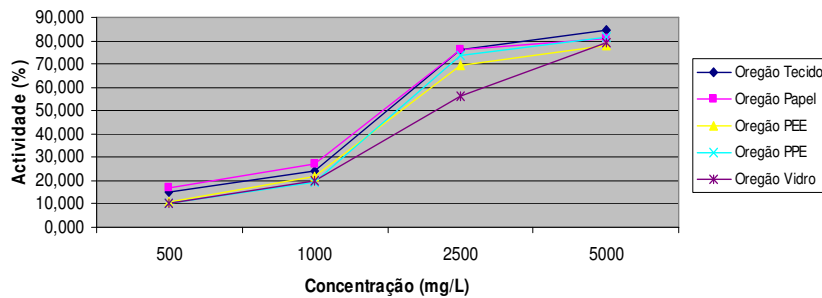


- Melhor actividade em 1ª colheita (18 meses) e 2ª colheita e 6 meses
- Nalguns casos a actividade atinge 60%
- Diferença importante entre TM PPE, TM P e TM tecido (mais fraco)

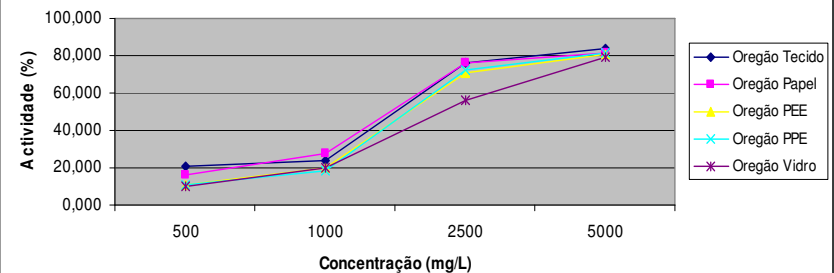
Origanum vulgare

Tempo = 30 min

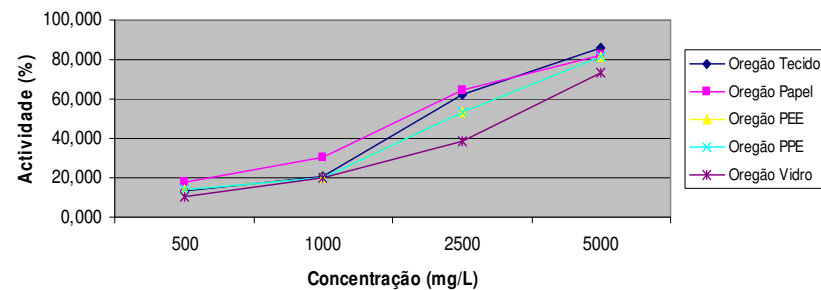
DPPH 1ª colheita (12 m) 30 minutos



DPPH 1ª colheita (18 m) 30 minutos



DppH 2ª colheita (6 m) 30 minutos

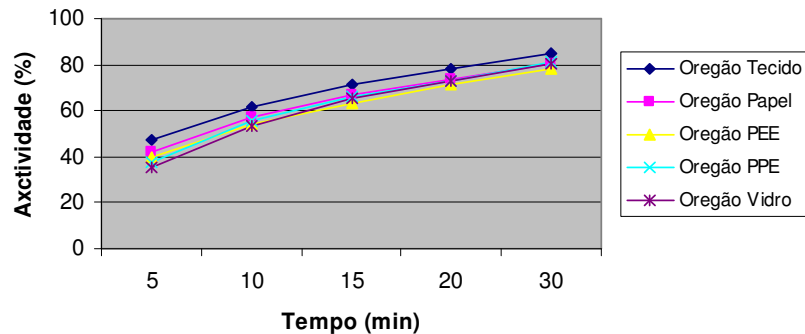


- Atividade aumenta com a concentração
- Atividade pode atingir 80% (5g/L)
- O vidro parece ter uma influência negativa na actividade (2,5g/L)

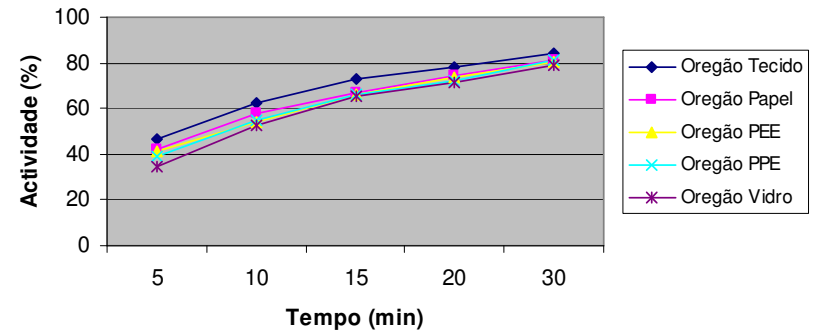
Origanum vulgare

Conc. = 5000 mg/L

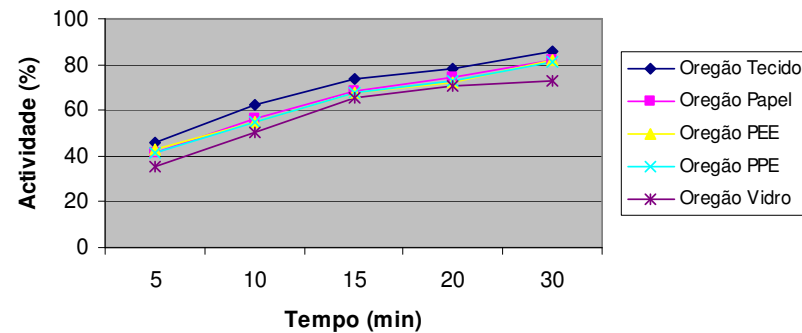
DPPH 1ª colheita (12 m)



DPPH 1ª colheita (18 m)



DPPH 2ª colheita (6 m)

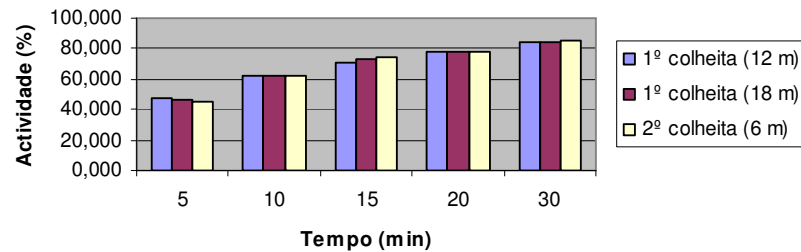


- A actividade atinge 80%
- Só as amostras da 2ª colheita, 6 meses, embaladas em vidro parecem ter menor actividade (<80%)

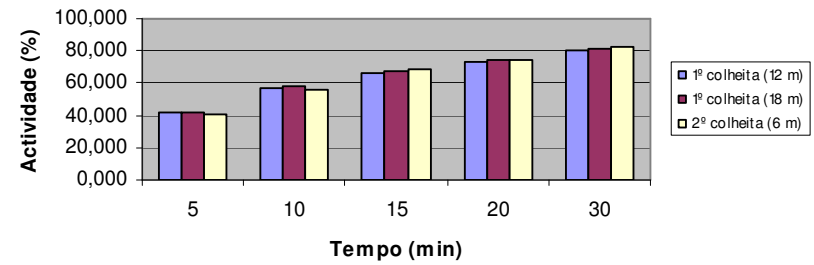
Origanum vulgare

Conc. = 5000 mg/L

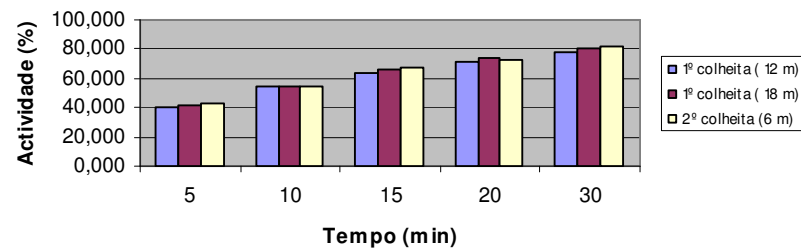
DPPH Oregão Tecido



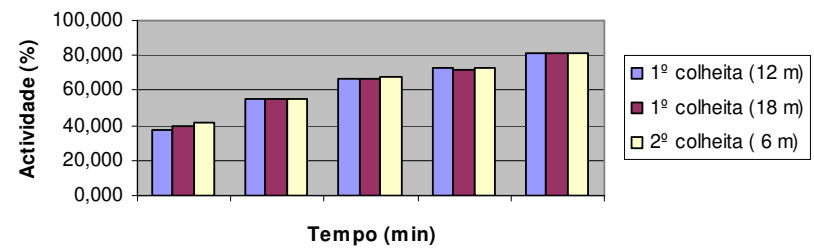
DPPH Oregão Papel



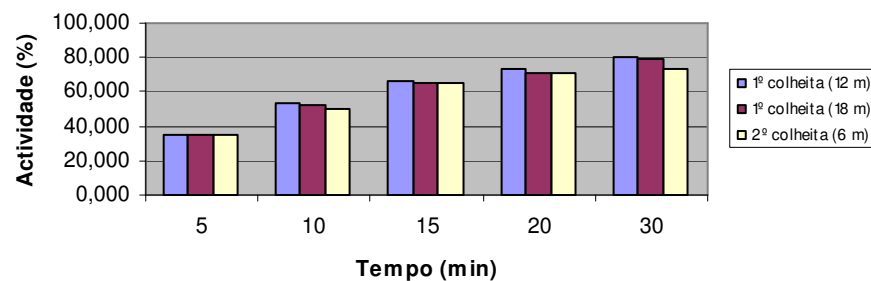
DPPH Oregão PEE



DPPH Oregão PPE



DPPH Oregão Vidro

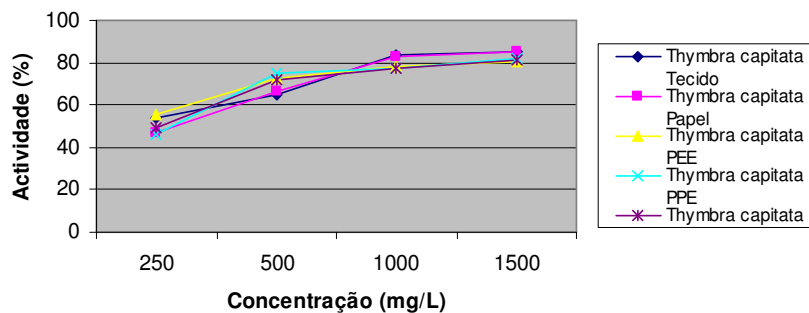


- Não aparece haver diferenças de actividade entre os tempos de colheita, independentemente do tipo de embalagem (excepção aparente 2ª colheita, vidro)

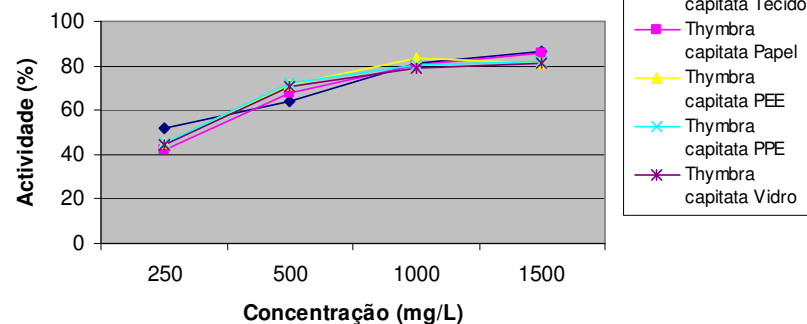
Thymbra capitata

Tempo = 30 min

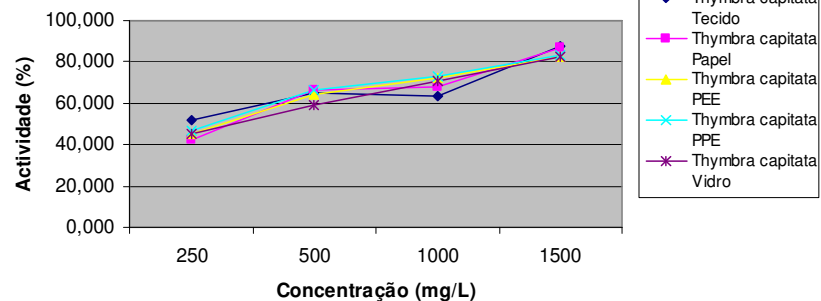
DPPH 1ª colheita (12 m) 30 minutos



DPPH 1ª colheita (18 m)



DPPH 2ª colheita (6 m)

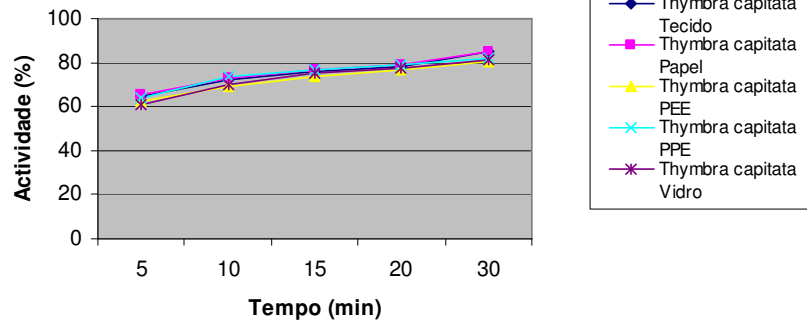


- A 500mg/L, a actividade atinge 60%
- A actividade atinge 80% a 1500mg/L
- Não há diferenças entre o tipo de embalagem

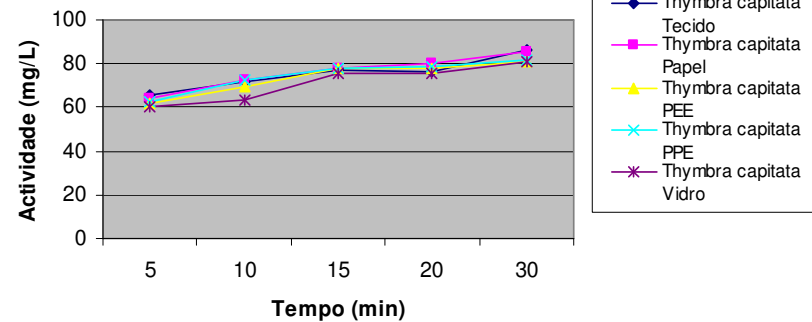
Thymbra capitata

Conc. = 1500 mg/L

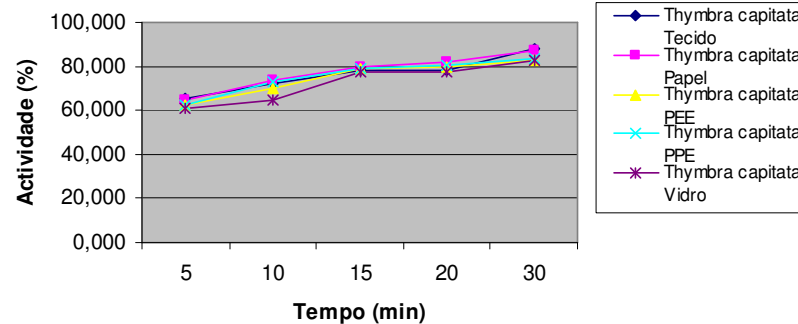
DPPH 1ª colheita (12 m)



DPPH 1ª colheita (18 m)



DPPH 2ª colheita (6 m)

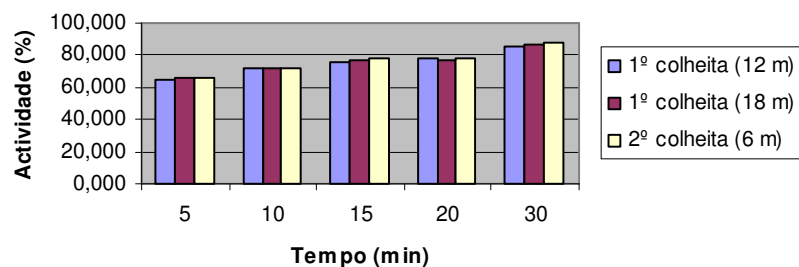


- A actividade atinge 80%
- Não há diferenças entre o tipo de embalagem

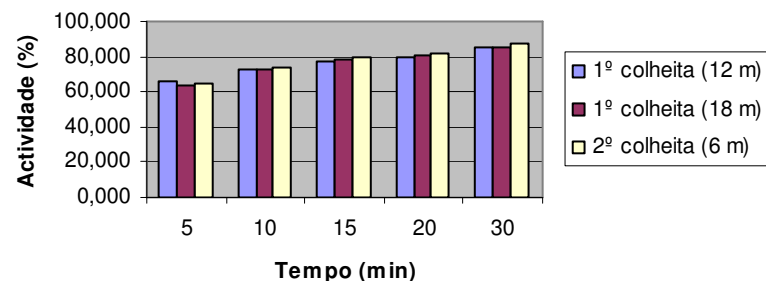
Thymbra capitata

Conc. = 1500 mg/L

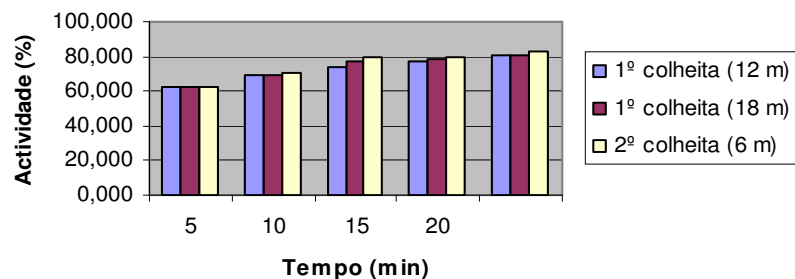
DPPH Orégão Tecido



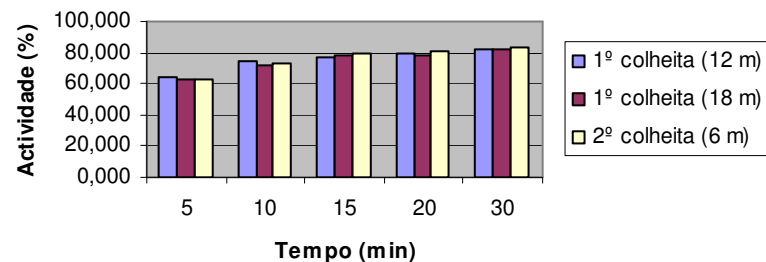
DPPH Orégão Papel



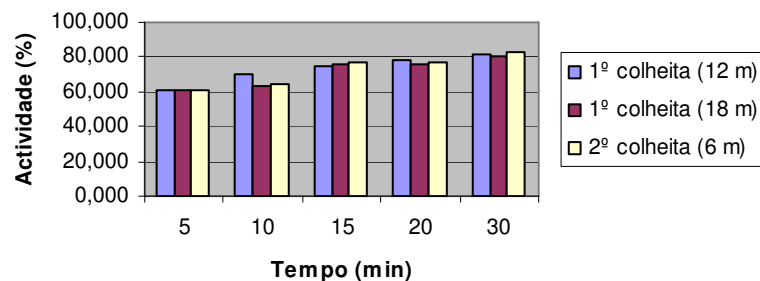
DPPH Orégão PEE



DPPH Orégão PPE



DPPH Orégão Vidro



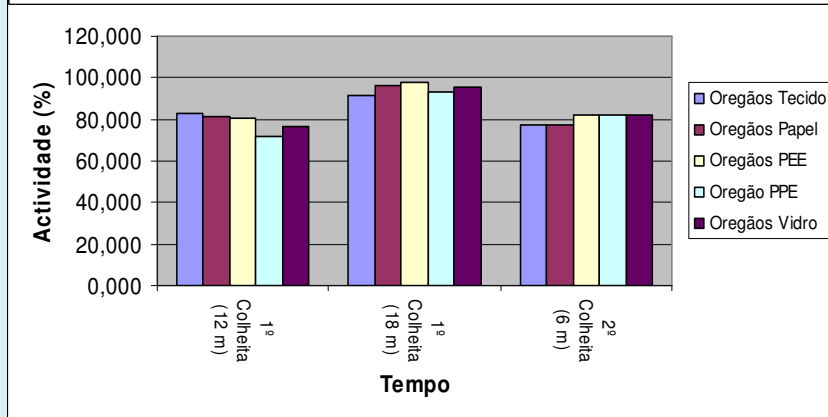
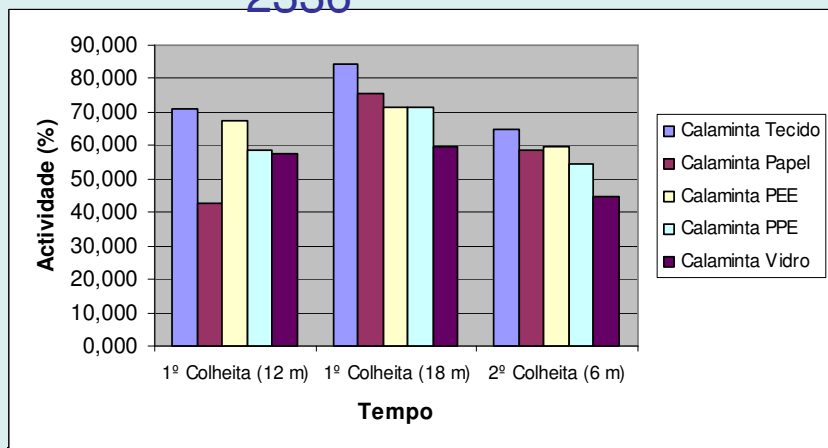
- Não aparece haver diferenças de actividade entre os tempos de colheita, independentemente do tipo de embalagem

DPPH

- Ordem decrescente de actividade:
 - *Thymbra capitata*: 80%, 1500mg/L, 30 min
 - Não há diferenças nas actividades conforme o tipo de embalagem
 - *Origanum vulgare*: 80% 5000mg/L, 30 min (2500mg/L: 39-64%, vidro e papel)
 - O vidro parece induzir menor actividade (2500mg/L)
 - *Thymus mastichina*: <36% 2500mg/L, 30 min
 - Diferenças conforme o tipo de embalagem (geralmente, tecido com menor actividade)
 - *Calamintha baetica*: <20% 2300mg/L, 30 min
 - Difícil estabelecer relação embalagem-actividade

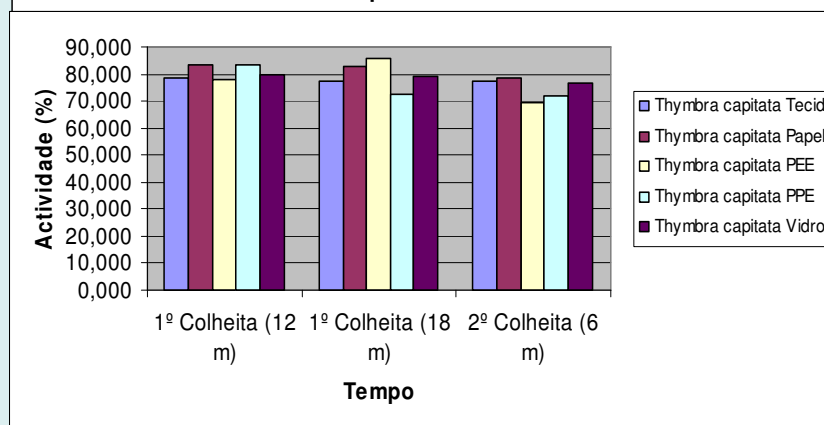
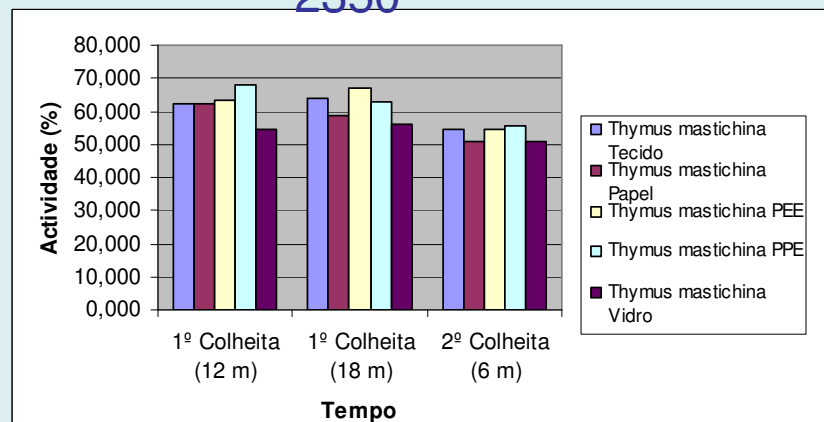
TBARS

2336



1000

2350

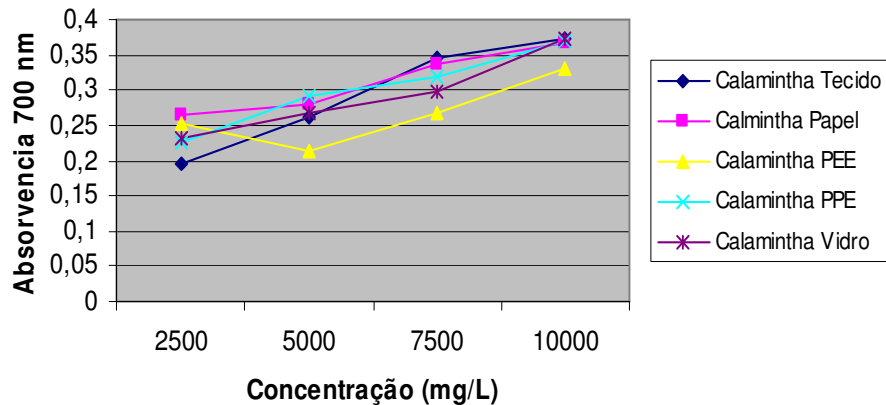


500

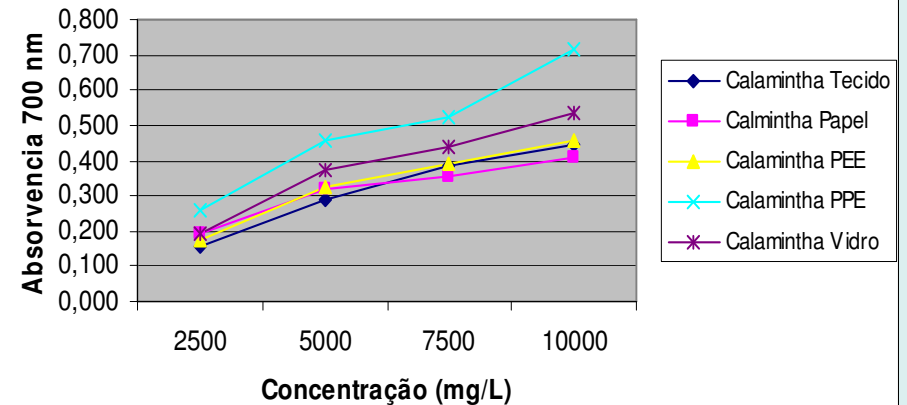
- As amostras de *Calamintha baetica* e *Th. mastichina* da 2ª colheita (6 meses de armazenamento) apresentam geralmente uma menor actividade.
- A altura da colheita e o tempo de armazenamento parece não influenciar as amostras de *T. capitata*
- As amostras de *Origanum vulgare* da 1ª colheita (18 meses de armazenamento) apresentam geralmente uma maior actividade.

Poder redutor

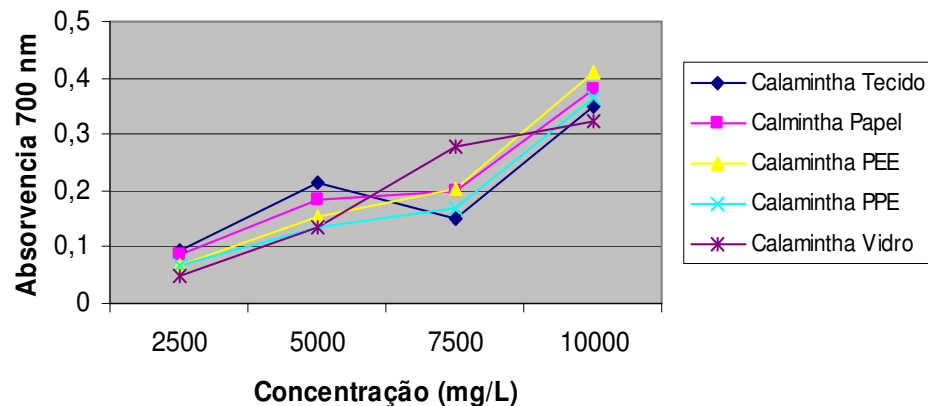
Poder Redutor 1ª colheita (12 m)



Poder Redutor 1ª colheita (18 m)



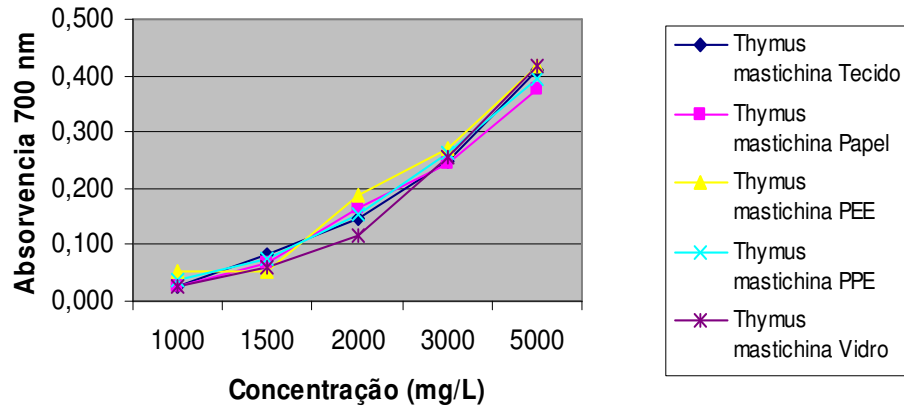
Poder Redutor 2ª colheita (6 m)



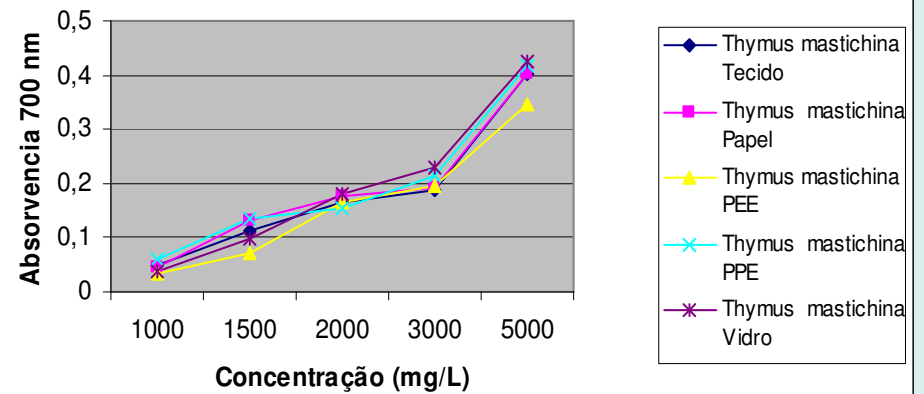
- Aparentemente a 1ª colheita (armazenada durante 18 meses) parece apresentar maior poder redutor
- Na 1ª colheita (18 meses) PPE maior actividade

Poder redutor

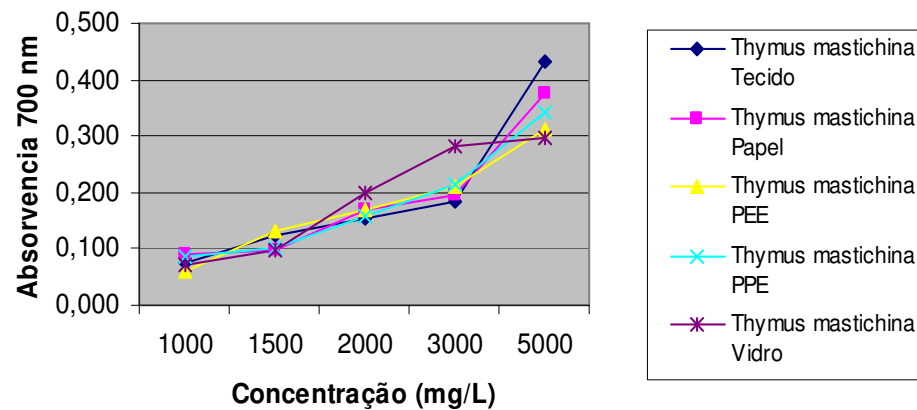
Poder Redutor 1ª colheita (12 m)



Poder Redutor 1ª colheita (18 m)



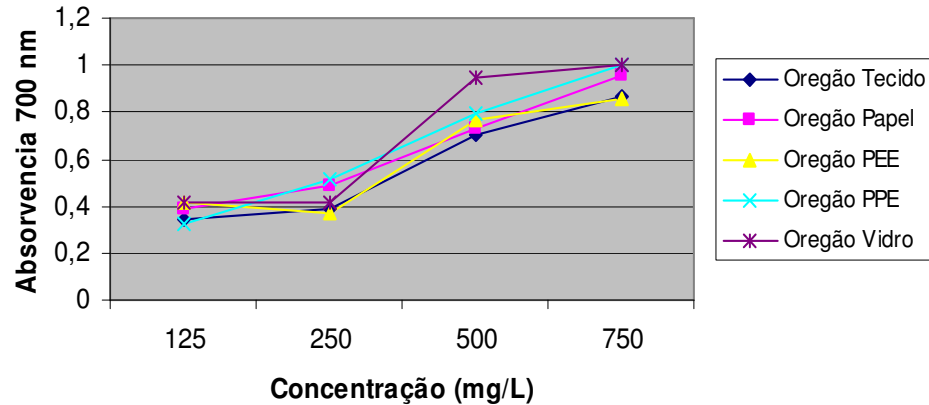
Poder Redutor 2ª colheita (6 m)



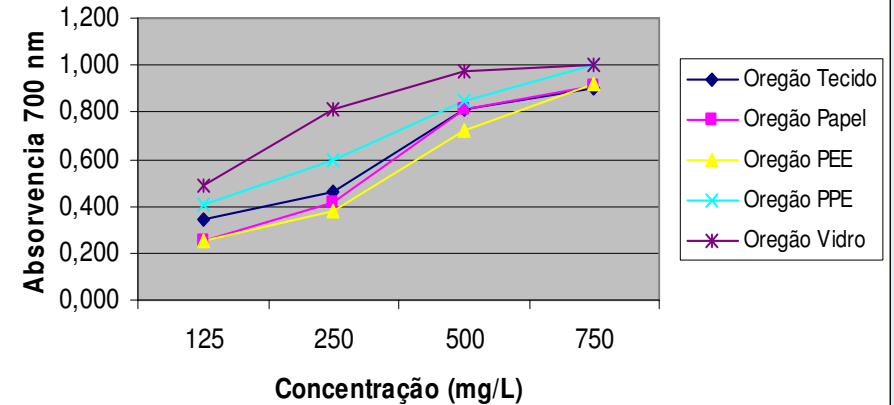
• Não parece haver diferenças entre tipo de armazenamento e colheita

Poder redutor

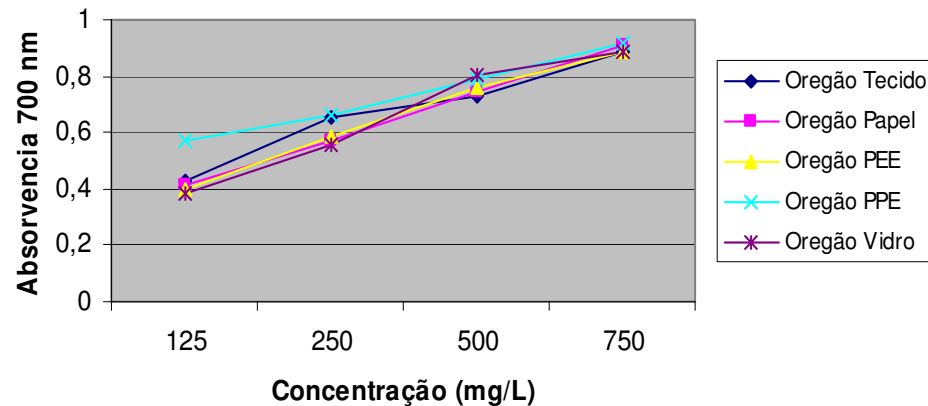
Poder Redutor 1ª colheita (12 m)



Poder Redutor 1ª colheita (18 m)



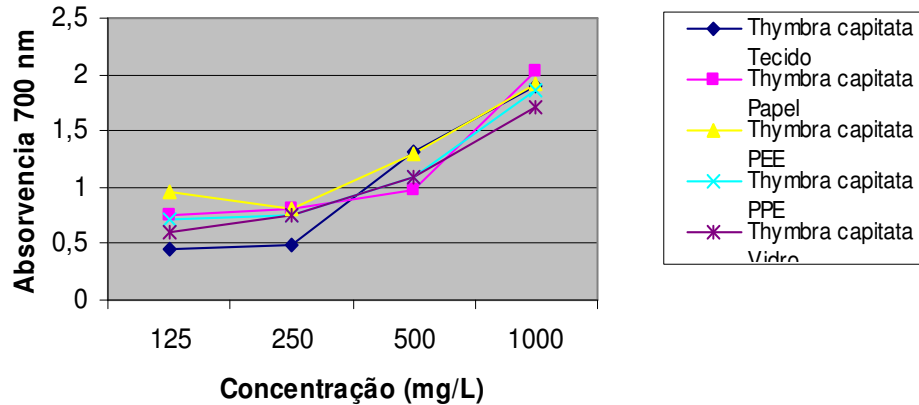
Poder Redutor 2ª colheita (6 m)



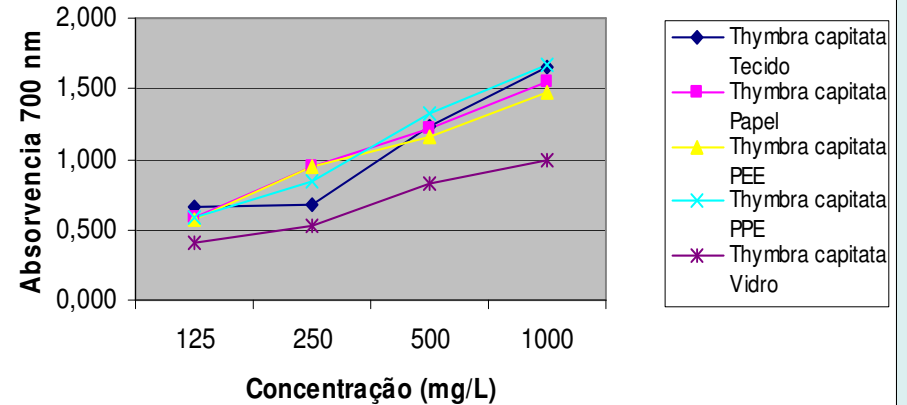
- As diferenças que se verificam são mais evidentes nas amostras da 1ª colheita, 18 meses de armazenagem
- As amostras armazenadas no vidro apresentaram maior actividade redutora.

Poder redutor

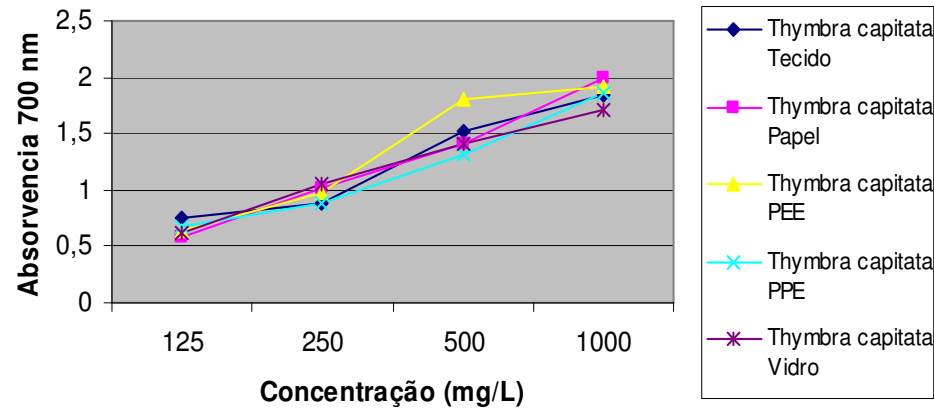
Poder Redutor 1ª colheita (12 m)



Poder Redutor 1ª colheita (18 m)



Poder Redutor 2ª colheita (6 m)



- Menor poder redutor nas amostras da 1ª colheita e armazenadas durante 18 meses
- Menor actividade nas amostras armazenadas em vidro da 1ª colheita e armazenadas durante 18 meses

Poder redutor

- Ordem decrescente de actividade:

Thymbra capitata
Origanum vulgare
Thymus mastichina
Calamintha baetica

Tal como no DPPH

- **Comparação entre métodos :**
 - Não é possível fazer porque
 - Os mecanismos são diferentes

Toxi-Infecções alimentares



São doenças infecciosas causadas pelo consumo de alimentos ou água contaminados.

- Conhecem-se mais de 250 doenças deste tipo.
- Estas doenças têm origem microbiana.
- Os sintomas traduzem-se por diarreia e vômitos.



Mais de 90% destas doenças por ano são provocadas por:

Staphylococcus aureus,

Salmonella spp.

Clostridium perfringens,

Campylobacter spp., *Listeria monocytogenes*,

Vibrio parahaemolyticus, *Bacillus cereus*,

entero-patogénicas *Escherichia coli* e *Shigella* spp.

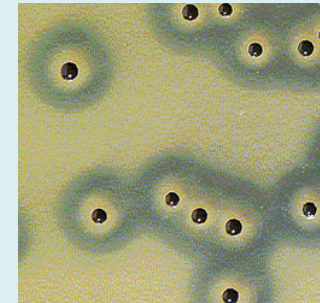
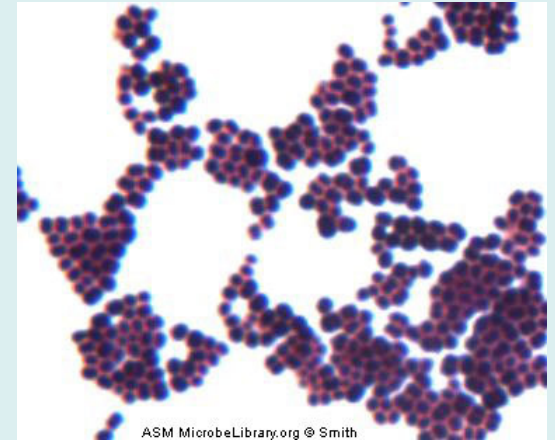


Staphylococcus aureus

Gram + cocci

Coagula o plasma de coelho

Produce uma enterotoxina termo - resistente



Em alimentos:

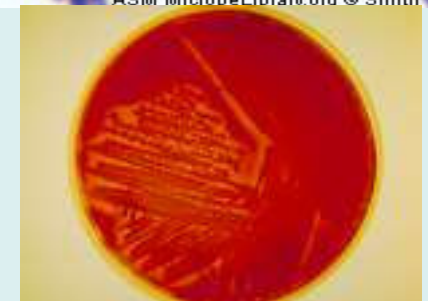
1. Mal cozinhados ou em carnes muito manuseadas (aves domésticas, presunto e outros produtos de charcutaria)
2. Produtos lácteos e doçaria

Bacillus cereus

Bacilos Gram⁺

Esporulados

β -hemolíticos



Síndrome diarreico (os vômitos estão ausentes)

Alimentos implicados: grande variedade de alimentos, incluindo carne e vegetais, molhos, massas, sobremesas e produtos lácteos.

Síndrome emético (acompanhado de vômitos).

Alimento implicado: Arroz cozinhado mantido à temperatura ambiente por períodos longos e antes de ser consumido é aquecido rapidamente

Estirpes bacterianas e determinação da actividade antibacteriana

- 4 estirpes de *Staphylococcus aureus* (CFSA1; CFSA2; CFSA3; CFSA4).
- 3 estirpes de *Bacillus cereus* (C1010; C1060; C1062).
- A actividade antibacteriana foi determinada através do método de difusão em agar no meio Brain Heart Infusion. O óleo essencial foi eluído em 2-propanol. Colocou-se 4 µl do óleo essencial em cada disco.

Antibacterial activity of *Origanum* spp and *Calamintha baetica* essential oils

Bacterias	Óleo Essencial		Antibiotico
	<i>Calamintha baetica</i>	<i>Origanum</i> spp	
CFSA1	5.50±1.06	11.25±3.25	26.00±1.00
CFSA2	8.75±0.35	16.50±4.80	27.00±1.41
CFSA3	7.67±0.58	13.33±2.08	24.66±0.57
CFSA4	9.33±0.58	18.33±2.88	24.00±1.00
<i>B. cereus</i> C1010	8.67±0.56	12.33±1.52	24.00±0.00
<i>B. cereus</i> C1060	*	8.67±0.57	18.33±1.15
<i>B. cereus</i> C1062	8.67±0.58	22.00±2.64	25.00±0.00

A zona de inibição é expressa em mm±SD (n=3).

*-sem zona de inibição

Conclusões

- O óleo de *Calamintha* não apresentou actividade contra as estirpes *St. aureus* ou *B. cereus*
- O óleo de *Origanum* spp demonstrou uma actividade inferior à do antibiótico

A utilização do óleo de *Origanum* spp pode ser utilizado como uma boa alternativa no controlo de microrganismos patogénicos nas indústrias alimentares.