

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
LINHA DE PESQUISA: QUÍMICA DE PRODUTOS NATURAIS

MATEUS SOUSA PORTO

Estudo comparativo do OET rendimento e da composição química do óleo essencial do *Thymus vulgaris* (Lamiaceae) cultivado sob diferentes níveis de sombreamentos em malhas

JEQUIÉ -BA

NOVEMBRO / 2024
MATEUS SOUSA PORTO

**Estudo Comparativo Do OET Rendimento E Da Composição
Química Do Óleo Essencial Do *Thymus Vulgaris* (Lamiaceae)
Cultivado Sob Diferentes Níveis De Sombreamentos Em Malhas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte dos requisitos
para a obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração: Química Analítica.

Orientadora: Prof.^a Dra Rosane Moura Aguiar

JEQUIÉ -BA

P853e Porto, Mateus Sousa.

Estudo comparativo do OET rendimento e da composição química do óleo essencial do *thymus vulgaris* (Lamiaceae) cultivado sob diferentes níveis de sombreamentos em malhas / Mateus Sousa Porto.- Jequié, 2024.

65f.

(Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, sob orientação Profa. Dra. Rosane Moura Aguiar)

1.Óleo essencial 2.Thymus vulgaris 3.Sombreamento 4.PCA 5.Antimicrobiano
6.RRFI Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia II.Título

CDD – 540

Rafaella Cância Portela de Sousa - CRB 5/1710. Bibliotecária – UESB - Jequié

TERMO DE APROVAÇÃO

MATEUS SOUSA PORTO

“Estudo comparativo do teor e composição química do óleo essencial de *Thymus vulgaris* L. (Lamiaceae) cultivado sob diferentes níveis de sombreamento.”.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química.

COMISSÃO EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 ROSANE MOURA AGUIAR
Data: 20/12/2024 12:14:11-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Rosane Moura Aguiar
(UFBA, Salvador – BA, 2008)
(Orientadora)

Documento assinado digitalmente
 BARAQUIZIO BRAGA DO NASCIMENTO JUNIOR
Data: 03/02/2025 15:50:20-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Baraquizio Braga do Nascimento Junior
(UFRJ, Rio de Janeiro – RJ, 2008)

Documento assinado digitalmente
 SIMONE ANDRADE GUALBERTO
Data: 31/01/2025 11:13:40-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dra. Simone Andrade Gualberto
(UFMG, Belo Horizonte – MG, 2001)

Dissertação aprovada pelo Colegiado do Curso de Pós-graduação em Química em 20 / 12 / 2024.

AGRADECIMENTOS

Com gratidão no coração, gostaria de agradecer profundamente à minha mãe e minha irmã, por todo o apoio incondicional e por não medirem esforços para me incentivar na busca pelos meus objetivos, possibilitando que eu estivesse aqui hoje. Agradeço também aos meus amigos, pelo apoio constante e pelo incentivo em cada etapa desse percurso.

Estendo minha gratidão aos demais familiares, que compreenderam a importância deste período em minha vida, oferecendo suporte nos momentos necessários, segurança, paciência e compreensão.

Meu sincero agradecimento vai a todos os professores e colaboradores do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (PGQUI), pela oportunidade que me concederam, pelos valiosos ensinamentos compartilhados e pelo acolhimento ao longo dessa jornada. Aos amigos e colegas do programa, sou grato pelas contribuições, pela troca de ideias e pela parceria que tornaram o caminho mais leve e enriquecedor. À minha orientadora, Prof.^a Dra. Rosane Moura Aguiar, agradeço profundamente pelas oportunidades de aprendizado, pelo incentivo e pelas contribuições inestimáveis ao meu desenvolvimento pessoal e profissional durante essa etapa. Um agradecimento especial às minhas colegas de laboratório Bárbara, Yane, Patrícia, Lucas e Rafaela, por dedicarem seu tempo e esforços para a concretização dos trabalhos que desenvolvemos juntos.

Agradeço ainda à Prof.^a Dra. Simone Andrade Gualberto, pela parceria, amizade e apoio, que abriram tantas portas para a realização desta jornada. Não poderia deixar de mencionar o Laboratório de Produtos Naturais (Lapron), que foi minha segunda casa por tanto tempo. Sou grato pelas trocas de conhecimentos, experiências, alegrias e desafios que vivemos juntos.

Por fim, meu reconhecimento e gratidão a todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para que este trabalho fosse concluído. Cada gesto, conselho e apoio foi essencial para alcançar este momento. Muito obrigado!

“O importante é não parar de questionar; a curiosidade tem sua própria razão de existir” (Albert Einstein)

LISTAS DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Registro do percentual de umidade e temperatura da região de cultivo.....19

Figura 2. Registro do percentual de umidade e temperatura da região de cultivo.....19

CAPÍTULO II

Figura1. Contribuintes de ressonância no íon fenóxido.....55

Figura 2. Figura 2 – Mecanismo esquemático de reação sal de Fast Blue e composto fenólico.....56

Figura 3. Estrutura do Timol.....57

LISTAS DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1. Níveis de sombreamento e OET de rendimento de óleo essencial em <i>Thymus</i> <i>vulgaris</i>	
L.....	20

Tabela 2. Valores dos coeficientes de correlação gerados em relação a cada variável distribuída em cada componente principal (CP).....	24
---	----

Tabela 3. Análise microbiológica de óleos essenciais em tratamentos a pleno sol e 100% de sombreamento.....	25
--	----

Capítulo II

Tabela 1. Resultados dos testes de avaliação da atividade antioxidante do óleo essencial de tomilho com seus respectivos desvios padrão.....	53
---	----

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OET Óleo Essencial *Thymus Vulgaris L*

OE Óleo Essencial

INMET Instituto Nacional de Meteorologia

CG-MS Cromatografia gasosa acoplada a espectro de massas

CG- FID cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização por chama

RRF Fator de resposta relativa

PCA Análises de componentes Principais

FT Fenólicos Totais

OET100 Óleo essencial tratamento nível de sombreamento 100%

OET70 Óleo essencial tratamento nível de sombreamento 100%

OET50 Óleo essencial tratamento nível de sombreamento 100%

OETPS Óleo essencial tratamento nível de sombreamento 100%

Estudo comparativo do OET rendimento e da composição química do óleo essencial do *Thymus Vulgaris* (Lamiaceae) cultivado sob diferentes níveis de sombreamentos em malhas

Autor: Mateus Sousa Porto

Orientadora: Rosane Moura Aguiar

Resumo: Esta pesquisa tem como foco analisar a composição química dos óleos essenciais *Thymus vulgaris* (Lamiaceae), popularmente conhecido como tomilho. O objetivo foi avaliar o rendimento do OE, a composição química, a atividade antimicrobiana e os parâmetros morfológicos dos espécimes cultivados sob diferentes níveis de sombreamento. Os espécimes de *T. vulgaris* foram cultivados em quatro tratamentos, em relação aos níveis de sombreamento aplicados: 100%, 70%, 50% e pleno sol. Foram avaliados os parâmetros morfológicos altura da planta, diâmetro do caule, matéria fresca e OETs de clorofila. Os óleos essenciais de *T. vulgaris* (OET) foram obtidos dos diferentes grupos (OET100, OET70, OET50 e OETPS), por hidrodestilação. Os rendimentos foram calculados pelas proporções entre o conteúdo de rendimento do OE e a massa da planta usada. Os constituintes químicos do OE foram identificados por GC-MS e quantificados por GC-FID, com Fatores de Resposta Relativa (RRFs). O timol foi identificado como o principal constituinte do OE nos diferentes tratamentos. A ação antibacteriana foi estudada contra as bactérias gram-positivas *Escherichia Coli* (ATCC 8739), *Salmonella spp* (CBAM 0015), *Pseudomas aeruginosa* (ATCC 25853) e gram-negativas *Enterococcus Faecalis* (ATTC 31299), *Staphylococcus 47 Saprophyticus* (ATCC 35552) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25921). A análise de componentes principais (PCA) permitiu estabelecer a correlação entre as variáveis de composição química do OE, rendimento e fatores morfológicos com os diferentes tratamentos de sombreamento aplicados no cultivo das plantas, apontando os comportamentos diferenciados entre os tratamentos. Assim, conclui-se que, no TOEFS, foram demonstrados melhores parâmetros de desenvolvimento e síntese de constituintes químicos relacionados ao estresse por radiação luminosa na cultura.

Palavras-chave: Óleo essencial, *Thymus vulgaris*, Sombreamento, PCA, Antimicrobiano, RRF

Chemical composition and microbiological potential of *Thymus vulgaris* L. essential oil grown under different shading levels

Autor: Mateus Sousa Porto

Orientadora: Rosane Moura Aguiar

ABSTRACT: This research aims to study the chemical composition of *Thymus vulgaris* (Lamiaceae) essential oils (EO), popularly known as thyme. The objective was to evaluate EO yield, chemical composition, antimicrobial activity and morphological parameters of specimens grown under different shading levels with shading screens. *T. vulgaris* specimens were grown under four treatments, in relation to the shading levels applied: 100%, 70%, 50% and full sun. The morphological parameters plant height, stem diameter, fresh matter and chlorophyll content were evaluated. *T. vulgaris* EOs (OET) were obtained from the different groups (OET₁₀₀, OET₇₀, OET₅₀ and OETPS), by hydrodistillation. Yields were calculated by the ratios between EO yield content and the plant mass used. The chemical constituents of EO were identified by GC-MS and quantified by GC-FID, with Relative Response Factors (RRFs). Thymol was identified as the major constituent in EO in the different treatments. The antibacterial action was studied against the gram-positive bacteria *Escherichia Coli* (ATCC 8739), *Salmonella* spp (CBAM 0015), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25853) and gram-negative *Enterococcus Faecalis* (ATCC 31299), *Staphylococcus Saprophyticus* (ATCC 35552) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 25921). Principal component analysis (PCA) allowed to establish the correlation between the chemical composition variables of EO, yield and morphological factors to the different shading treatments applied in plant cultivation, pointing out the differentiated behaviors among treatments. Thus, it is concluded that, in TOE_{FS}, better parameters of development and synthesis of chemical constituents related to stress by light radiation on the crop were demonstrated.

Keywords: Essential oil; *Thymus vulgaris*; Shading; PCA; Antimicrobial; RRF.

SUMÁRIO

Introdução.....	14
2. Metodologia	16
2.1. Cultivo de espécies e área experimental	16
2.2. Parâmetros morfológicos.....	16
2.3. Obtenção e identificação dos constituintes químicos dos óleos essenciais de <i>T. vulgaris</i> (OET)	17
2.4. Quantificação dos constituintes químicos no OET.....	18
2.5. Ensaio de atividade antibacteriana	19
2.6. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	19
2.7. Avaliação da concentração bactericida mínima (CBM).....	20
2.8. Análise estatística.....	21
3. Resultados e discussão.....	21
3.1 Monitoramento da área experimental	21
3.2. Composição química da OET	21
3.3. Análise exploratória (ACP).....	23
3.4. Análise Microbiológica	26
4. Conclusão	28
5. REFERÊNCIAS.....	30
Capítulo II	48
Estudo comparativo entre os testes de OETr de fenólicos usando os reagentes de Fast blue e Folin-Ciocalteu sobre extrato etanólico e óleo essencial comercial de <i>Thymus Vulgaris</i> L. (Lamiaceae)	49
RESUMO	50
INTRODUÇÃO	51
1. MATERIAL E MÉTODOS	53
1.1 Determinação de Fenólicos Totais pelo Método Folin-Ciocalteu	54
1.2 Determinação de Fenólicos Totais pelo Método Fast Blue.....	54
2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
3. CONCLUSÃO	60
4. REFERÊNCIAS.....	61

Apresentação

A dissertação de mestrado apresentada é fruto do desenvolvimento do projeto de pesquisa "Estudo comparativo do OET, rendimento e da composição química do óleo essencial de *Thymus vulgaris* (Lamiaceae) cultivado sob diferentes níveis de sombreamento em malhas". Esse projeto foi contemplado no edital de bolsa de mestrado da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

A pesquisa foi realizada em parceria com o Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Campus de Itapetinga, juntamente com o Laboratório de Óleos Essenciais e o Laboratório de Cromatografia Dr. Jailson Bittencourt, ambos no Campus de Jequié. No Campus de Itapetinga, foi conduzido o cultivo e acompanhamento da espécie em área experimental e as análises microbiológicas no Laboratório de biotecnologia e microbiologia ambiental coordenado por Prof. Dr^a. Simone Andrade Gualberto. Em seguida, no Campus de Jequié, foram realizadas as análises químicas do óleo essencial obtido.

Este trabalho foi elaborado no formato de publicação, conforme as orientações do Manual para Elaboração de Dissertações do Programa de Pós-Graduação em Química (PGQUI-UESB). A escrita da dissertação seguiu as diretrizes do periódico Natural Product Research para submissão, e o conteúdo será ajustado conforme as sugestões da banca, caso necessário.

Além do trabalho principal apresentado nesta dissertação, foram realizadas colaborações com outros pesquisadores do programa e de instituições externas, resultando em publicações (apresentadas nos anexos) em revistas científicas ou capítulos de livros.

Link para acesso ao Manual de dissertações do PGQUI:
http://www2.uesb.br/ppg/ppgquimica/wp-content/uploads/2018/09/Manual-paraelabora%C3%A7%C3%A3o-de-disserta%C3%A7%C3%A3o-Vers%C3%A3o-Final-_01.04.pdf

INTRODUÇÃO

O *Thymus vulgaris* L. pertence à família *Lamiaceae* e é uma erva medicinal aromática, conhecida popularmente como tomilho ou poejo no Brasil. Nativa do Mediterrâneo, é distribuída em diferentes regiões de vários países, devido ao seu uso como condimento [1].

O uso dessa erva aromática se estende a chá's e infusões na medicina popular, além de expectorantes, antitussígenos, antibroncolíticos, antiespasmódicos, anti-helmínticos, carminativos e diuréticos [2]. Além dos extratos botânicos, a *T. vulgaris* tem um rendimento considerável de óleo essencial, o que agrega mais valor ao seu cultivo, ampliando sua aplicabilidade em setores das indústrias farmacêutica e alimentícia [3].

Pesquisas voltadas para a análise da composição química e bioatividade de extratos botânicos e óleos essenciais (OE) demonstram atividade biológica contra fungos, bactérias, patógenos orais, antioxidantes, tratamento de problemas gastrointestinais e inflamatórios, além da presença de metabólitos secundários, que são os compostos bioativos responsáveis pelos efeitos farmacológicos [4-6].

O método de cultivo de espécies botânicas do gênero *Thymus* determina as principais características da espécie e influencia a biossíntese de metabólitos secundários. Além disso, permite a racionalização do cultivo, garantindo a disponibilidade para uso [7-10]. Pesquisas que buscam entender como os fatores agroecológicos externos de temperatura, luz, umidade e solo influenciam várias espécies de plantas foram desenvolvidas e encontraram relações diretas com o crescimento, o rendimento e o desenvolvimento reprodutivo [11-14].

A luminosidade e a temperatura de cultivo destacam-se como os fatores que mais carecem de compreensão, pois, segundo Silva et al. [15], são cruciais para o processo fotossintético, contribuindo para o desenvolvimento fisiológico das plantas, além de atuarem direta ou indiretamente no regime térmico para a geração de fitomassa e nos processos de evapotranspiração.

A variação na composição química dentro da espécie permite a identificação de seis quimiotipos, nomeados de acordo com o constituinte principal, tais como: geraniol, linalol, gama-terpineol, carvacrol, timol e trans-thujan-4-ol/terpinen-4-ol. A composição química e o OETr de OE da *T. vulgaris*

sofrem grandes variações devido a diversos fatores, como ambientais, geográficos, manejo da cultura, nutrição foliar e estresse hídrico controlado [16-18].

Ferramentas estatísticas multivariadas, como a análise de componentes principais (PCA), têm sido cada vez mais usadas no campo da química de produtos naturais para detectar adulterações, anomalias ou tendências de agrupamento de dados. Nesse contexto, investigamos a composição fitoquímica de compostos voláteis de espécies de *Thymus* usando GC-MS. Em estudos, Ali-Arab et al. aplicaram a PCA para avaliar a variabilidade na composição do óleo essencial em diferentes populações de *Thymus daenensis* Celak. do Irã. Os dois primeiros PCs foram responsáveis por 80,0% da variação total [20]. Nutrizio et al. usaram a PCA como uma ferramenta multivariada para avaliar o potencial de solventes verdes para a extração de compostos bioativos e óleos essenciais do *Thymus serpyllum* L.; 69,9% da variação total foi explicada na PC1 e PC2, e o principal composto fenólico encontrado nos extratos foi o ácido rosmarínico, enquanto o composto volátil predominante foi o carvacrol [21-25].

Nesta pesquisa local selecionado foi município de Itapetinga-BA que faz parte da Região Sudoeste da Bahia e está localizado em uma zona de transição entre as áreas úmidas do litoral e a região semiárida do interior baiano. Destaca-se também por ser um município com intensa produção agrícola, o que o torna benéfico para o estudo da viabilidade do cultivo de plantas, com vistas à produção econômica. O potencial farmacológico e comercial da *T. vulgaris* deve ser avaliado em relação a diferentes formas de cultivo, permitindo compreender as condições promissoras à luz da fisiologia da planta.

Não há registros de estudos sobre o cultivo de *T. vulgaris* na região mencionada na literatura. Assim, este estudo teve como objetivo verificar a influência da produção de matéria fresca, o rendimento e a composição qualitativa e quantitativa dos componentes químicos do OE por meio da metodologia fatores de resposta relativos RRF, além do potencial microbiológico por meio da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da atividade bactericida (CBM), características do desenvolvimento da planta em *Thymus Vulgaris* L. exposta a diferentes níveis de sombreamento. A PCA foi usada para

avaliar as correlações entre a composição química e os aspectos morfológicos sob os diferentes modos de sombreamento.

2. METODOLOGIA

2.1. Cultivo de espécies e área experimental

A amostra utilizada neste estudo foi coletada sob as coordenadas latitude 15°15'16.61"S e longitude 40°16'26.14"W, no período de agosto/2022 a março/2023, cujo clima é tropical úmido com estação seca, de acordo com a classificação de Koppen; regiões com essa característica climática apresentam amplitudes pluviométricas entre 750 e 1800 mm/ano, e temperatura entre 20 e 29 °C.

As mudas foram cultivadas em casa de vegetação, germinando 1.300 mg de sementes de ISLA *Thymus vulgaris* compradas em lojas locais. As sementes foram colocadas em três bandejas de germinação com 128 células contendo substrato comercial, e quatro sementes foram distribuídas em cada célula. Onze dias após o plantio, as mudas emergiram de forma uniforme e homogênea. Após 45 dias, com altura média de três cm, foram transferidos para 286 sacos de mudas.

Quando atingiram a altura de 15 cm, as plantas foram transferidas para o campo, com uma área de 30 metros quadrados cercada e dividida em 5 fileiras, previamente adubadas com aproximadamente 10 kg de esterco de *Cavia porcellus* (popularmente conhecido como cobaia). As plantas foram submetidas a quatro níveis de sombreamento: 100%, 70%, 50% e 0% (pleno sol), protegidas com telas de sombreamento que controlam a passagem da luz fotossinteticamente ativa, adquiridas em lojas agrícolas da região.

Dados climáticos como temperatura, umidade e precipitação pluviométrica foram obtidos a partir de coleta diária com termo-higrômetro; Os dados climáticos da cidade foram coletados com a Estação Meteorológica de Superfície Automática [26].

2.2. Parâmetros morfológicos

Os parâmetros morfológicos altura e diâmetro da haste foram obtidos usando paquímetros analógicos universais de 200 mm / 8" (Eda™); O teor de clorofila foi obtido por meio da medição com um medidor de clorofila CL-01

Hansatech™ e matéria fresca, por meio da pesagem do material vegetal coletado instantaneamente.

O delineamento experimental do plantio foi inteiramente casualizado; Para análise do crescimento e diâmetro do caule, vinte e cinco repetições foram utilizadas em cada tratamento; para análise do índice de clorofila, foi utilizado um medidor portátil SPAD, três repetições foram realizadas em cada tratamento.

Na colheita, após 62 dias de tratamento, foram determinados os seguintes dados: diâmetro do caule (cm) com paquímetro digital, altura da planta (cm) com régua graduada, peso da matéria fresca e do óleo essencial (g) com balança analítica, e a porcentagem de óleo essencial (%) foi calculada pela razão entre a massa de óleo essencial e a massa vegetal utilizada em cada tratamento. A análise de variância e os gráficos foram plotados usando o SigmaPlot™ (Statistics Software Inc.)

2.3. Obtenção e identificação dos constituintes químicos dos óleos essenciais de *T. vulgaris* (OET)

As brotações de *T. vulgaris* foram coletadas no início do florescimento 62 dias após o transplântio. O material vegetal foi triturado, homogeneizado, pesado, separado em triplicatas e armazenado sob refrigeração, padronizado para um corte de 5 cm do solo, às 8 horas. O óleo essencial foi extraído por hidrodestilação [27], com amostras de parte aérea da planta, de cada tratamento, separadamente. O procedimento foi realizado por 120 minutos, a 52 ± 2 °C. Após extração e secagem, os óleos essenciais de *T. vulgaris* foram obtidos para os diferentes tratamentos de sombreamento.

Os componentes químicos do OET foram identificados por GC-MS (Shimadzu, QP2010), nas seguintes condições cromatográficas: coluna capilar DB-5 de 30 m × 0,25 mm de diâmetro interno, com filme de 0,25 µm constituído por dimetilpolissiloxano (95%) e fenil (5%), utilizando He como gás carreador, com fluxo de 1,8 mL·min⁻¹; temperatura do injetor de 220 °C; programa de aquecimento da coluna entre 40 °C e 240 °C, com uma taxa de 3 °C·min⁻¹. A temperatura da interface foi de 240 °C, fonte de íons, 220 °C (70 eV) e faixa de varredura de massa de 40 a 400 m.u. Os componentes do óleo essencial foram identificados por

comparação com seus índices de retenção (IR), calculados em uma série de n-alcenos (C₈-C₂₄), analisados nas mesmas condições e por comparação de seus espectros de massa com a biblioteca NIST-14.

2.4. Quantificação dos constituintes químicos no OET

Os constituintes do OET foram quantificados por cromatografia gasosa (GC-2010 Plus, Shimadzu) com detector de ionização de chama (GC-FID). Os parâmetros de ajuste para tipo de coluna, forno e temperatura foram os mesmos aplicados em CG-EM. As taxas de fluxo dos gases usados como carreadores (colunade ventilação dividida e purga de H₂), chama FID (H₂) e composição (N₂) foram de 14,0 mL·min⁻¹, 40 mL·min⁻¹ e 30 mL·min⁻¹, respectivamente. Uma vazão de 400 mL·min⁻¹ de ar sintético alimentou a chama FID. A razão de divisão da amostra foi de 1:10. Os parâmetros operacionais foram estabelecidos após a verificação da melhor resolução. As amostras foram injetadas em triplicata e os volumes de injeção foram de 1,0 µL.

Para os cálculos de quantificação dos constituintes, foi aplicada a metodologia de quantificação por fatores de resposta relativa (RRF). De acordo com Cachet et al. [28], esta técnica pode ser usada com qualquer cromatógrafo gasoso hifenizado a um detector de ionização de chama.

Os RRFs foram calculados para cada componente químico OET, conforme equação relatada por Tissot et al. [29]:

$$RRF = \frac{M_{w1}}{(M_{wPI}) - 61,5 + 88,8n_C + 18,75n_H - 41,3n_O + 6,4n_N + 64,0n_S + 127n_{Benz}} \quad (1)$$

Onde M_{w1} são as massas moleculares do analito; M_{wPI} é a massa do padrão interno (Geraniol); n_C , n_H , n_O , n_N , n_S , n_{Benz} são o número de átomos de carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, enxofre e número de anéis aromáticos, respectivamente.

Posteriormente, para o cálculo do valor de massa dos componentes da amostra real, relacionou-se a área cromatográfica e a massa do padrão interno e do FRR, com base na seguinte equação:

$$M_1 = \frac{A_1 M_p RRF}{A_p} \quad (2)$$

Em que A_1 é a área constituinte química, M_p é a massa do padrão

interno, RRF é o fator de resposta relativo e A_p é a área cromatográfica do padrão interno.

Para estabelecer uma comparação entre os valores obtidos por meio da equação (1) e atestar a eficiência do método, os constituintes foram quantificados sem o uso do FRR, de acordo com a equação.

$$M_1 = \frac{A_1 M_p}{A_p} \quad (3)$$

Onde A_1 é a área constituinte química, M_p é a massa do padrão interno, A_p é a área cromatográfica do padrão interno. Os resultados estão descritos nas **Tabela S1**(material suplementar).

2.5. Ensaio de atividade antibacteriana

Cepas bacterianas: As cepas bacterianas utilizadas nos ensaios foram obtidas da Coleção de Bactérias da Amazônia (CBAM), pertencente à Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), a saber: *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Salmonella* spp. (CBAM 0015), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25853), *Enterococcus faecalis* (ATCC 31299), *Staphylococcus saprophyticus* (ATCC 35552) *Staphylococcus aureus* (ATCC 25921). As cepas foram inoculadas em placas de Petri contendo meio de cultura em ágar Mueller Hinton (KASVI K25-1058) a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ em condições aeróbias em incubadora bacteriológica (Thoth digital bacteriology and culture incubator) (TH.520).

2.6. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada de acordo com o protocolo CLSI (2003) [30], com modificações. A análise foi realizada em placas de microtitulação de 96 poços com fundo em "U", nas quais 90 μL de caldo Mueller Hinton (KASVI K25-610034) foram pipetados em todos os poços. Posteriormente, 90 μL do óleo essencial foram adicionados à linha A (colunas 1 a 9) a $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ e diluições sucessivas foram realizadas até a linha H, descartando os 90 μL restantes da linha H após a homogeneização, resultando em oito diferentes concentrações testadas (10; 5,0; 2,5; 1,25; 0,625; 0,312; 0,156; $0,078 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$).

Para o teste, foi preparada uma solução padrão de cada microrganismo em

solução salina (0,9%), ajustando a concentração à da escala de McFarland (0,5), que corresponde a $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC)/mL. Posteriormente, 10 µL de suspensão do microrganismo teste foram adicionados aos poços a serem testados e a placa foi incubada a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$, por 24 horas.

Os controles foram realizados para cada microrganismo em teste. O primeiro controle utilizado foi o antibiótico Ofloxacina (0,3%). O segundo controle foi realizado cultivando os microrganismos testados em meio de cultura para verificar sua viabilidade. A esterilidade do meio também foi verificada em outros poços por pipetagem sem microrganismos. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Após o período de incubação da placa, para o desenvolvimento final, 30 µL de uma solução aquosa de Resazurina (Sigma-Aldrich R7017) a 0,01% foram adicionados e incubados a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$, por três horas. A presença de uma cor azul indica que a concentração testada foi capaz de inibir o crescimento, e uma cor rosa indica viabilidade celular, ou seja, na concentração em questão, o óleo essencial não é capaz de inibir o crescimento bacteriano. Essa mudança se deve à reação de redução que ocorre quando a resazurina encontra um metabolismo ativo. A concentração inibitória mínima (CIM) foi considerada como a menor concentração do óleo capaz de inibir o crescimento do microrganismo.

2.7. Avaliação da concentração bactericida mínima (CBM)

Após a determinação da CIM, avaliou-se a Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos óleos essenciais que apresentaram resultado positivo no ensaio anterior para verificar se os mesmos apresentavam atividade bactericida, ou seja, se são capazes de matar o microrganismo. Assim, foram coletados 5 µL da solução nos poços das placas de microtitulação que apresentaram atividade inibitória contra o microrganismo, inoculados em uma placa de Petri contendo meio ágar Mueller Hinton e colocados em estufa a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$. A análise foi realizada após 24 horas. A ausência de crescimento bacteriano na placa é um indicativo de atividade bactericida.

2.8. Análise estatística

Os resultados foram avaliados por meio da Análise de Componentes Principais (PCA) para investigar as correlações entre os atributos químicos e morfológicos em diferentes modos de cultivo (sol ou sombra). O Excel® (Microsoft Company) foi utilizado para o tratamento estatístico básico e o Statistica 12.0 (Stat Soft Company) foi utilizado para gerar os componentes principais.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Monitoramento da área experimental

Durante o preparo das mudas, foram monitoradas as variações médias de temperatura (T_a) na área de campo experimental de 19,3 °C a 37,7 °C, sendo 27,1 °C a temperatura instantânea, definida na coleta. A umidade média do ar foi de 68,90%, sendo 72,01% a máxima e 65,86% a mínima (**Figura. 1**).

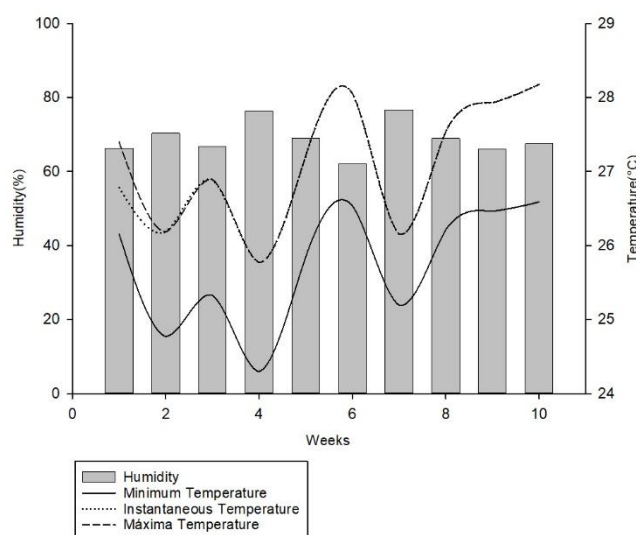


Figura. 1 Registro do percentual de umidade e temperatura da região de cultivo.

3.2. Composição química da OET

Os resultados das análises cromatográficas para os diferentes tratamentos (OET₁₀₀; OET₇₀; OET₅₀; OETPS) permitiu a identificação de dez constituintes químicos, seis dos quais foram identificados em todos os tratamentos (**Tabela S1 - Tabela S4**, Material suplementar). Certos constituintes químicos eram exclusivos de alguns tratamentos, como o α -tujanol, encontrado apenas no OETPS; Borneol, 4-terpineol e b-cariofileno, observados apenas em OET₅₀ e OET₇₀; os compostos hidrato de cis-sabeno, óxido de cariofileno e α -Thujene, em

OET₁₀₀.

O rendimento de óleo essencial, a matéria fresca, a clorofila total e as dimensões da estrutura da planta são apresentados na **Tabela 1**. O constituinte majoritário encontrado em todos os tratamentos foi o timol, variando de 15,217% a 29,848% da composição química identificada, levando à indicação do quimiotipo correspondente.

Na quantificação por RRF, um modelo matemático baseado na entalpia de combustão, uma propriedade termodinâmica pré-estabelecida na literatura [29]. Em conjunto, o método envolve a adição de um padrão interno, permitindo avaliar o efeito da matriz componente nas amostras, sem a necessidade de uma curva de calibração externa (ECC).

O modelo matemático RRF apresenta-se como uma alternativa à quantificação por CEC, assegurada por um fator de correção calculado por entalpia de combustão pré-estabelecida por fórmula molecular, propriedade físico-química intrínseca do composto quantificado, levando em consideração o efeito matriz e aspectos estruturais de cada constituinte presente na mistura.

Nos tratamentos analisados neste estudo, observou-se que aquele com maior exposição solar das mudas, a pleno sol, apresentou o maior OET_r de óleo essencial, além da observação do maior valor quantitativo de timol, 3,208 mg, correspondendo a 29,567% da massa de óleo essencial identificada (**Tabela S1-S6**, Material suplementar). No estudo realizado por Lalević et al. [31] sobre os níveis de sombreamento na espécie *T. vulgaris*, resultados semelhantes foram observados em tratamentos a pleno sol, onde os autores relacionam o resultado obtido ao ambiente de cultivo com alta radiação luminosa e temperatura. As complexas interações de fatores (temperatura, luz, umidade, incidência solar, balanço hídrico) podem resultar em variações significativas na produção e composição química dos óleos essenciais, demonstrando a participação do meio ambiente nos processos vitais da planta e na construção de sua fisiologia

Tabela 1. Níveis de sombreamento e OETr de rendimentos de óleo essencial *Thymus vulgaris* L.

OET	H (cm)	DC (mm)	FM (g)	MOE (g)	POE (%)	CLa (mg·g ⁻¹)
OET ₁₀₀	24.50 a	3.52 a	25.97 a	0.36 a	0.55 a	38.18 b
OET ₇₀	20.45 a	3.84 a,b	21.20 a,b	0.23 a	0.42 a	31.10 a
OET ₅₀	24.93 a	4.59 b	35.73 b	0.90 a	0.98 b	42.41 b
OETPS	23.77 a	5.18 b	37.05 b	0.90 a	0.97 b	31.94 a

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey HSD ao nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$). H: altura; DC: diâmetro do caule; FM: matéria fresca; MOE: massa de óleo essencial; POE: percentual de óleo essencial; CLa: Clorofila a (mg g⁻¹).

3.3. Análise exploratória (ACP)

A análise multivariada de PCA foi realizada em uma matriz de autoescalamento para 15 variáveis e 4 diferentes níveis de sombreamento. PCA é uma técnica que reduz a dimensionalidade do conjunto de dados original por meio de novas variáveis ortogonais, chamadas de componentes principais (PCs), mantendo a maior porção possível de variância [32]. Este tratamento matemático é uma alternativa interessante para melhorar a compreensão e interpretação dos dados, explorando a presença ou ausência de clusters entre as amostras [33].

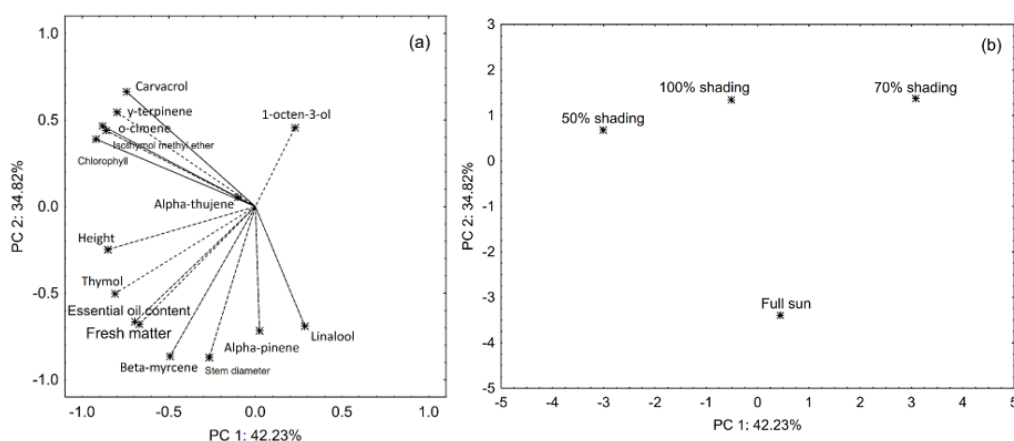


Figura. 2 (a) apresenta o gráfico de carregamento com os PCs mais significativos para os dados nas Tabelas S1-S4 (Material suplementar). Esse gráfico permite avaliar a contribuição de cada variável estudada na separação dos grupos. A Fig. 2 (b) apresenta o gráfico de pontuação para PC1 × PC2.

Quando cultivada a pleno sol (sem sombreamento), é possível verificar que a OETPS apresentou maior concentração das espécies alfa-pineno, beta-mirceno, linalol e timol. O timol é um constituinte majoritário presente na matriz do óleo essencial e a presença de maior incidência solar favorece o estresse hídrico das plantas, levando à síntese de compostos terpênicos. Tais compostos podem sofrer reações metabólicas e são convertidos por reações de oxidação enzimática, produzindo terpenos oxigenados ou terpenóides, como o timol e o linalol [34,35].

Com o cultivo sob 50% de sombreamento (OET50), foram encontradas concentrações mais elevadas de carvacrol, γ -terpineno, o-cimeno, éter metílico de isotimol e clorofila total. Uma vez que o carvacrol é um monoterpene fenólico isômero do timol, a sua atividade ótica é diferenciada pela ação enzimática na síntese biometabólica [36]. Uma vez que a atividade enzimática pode ser estimulada pela incidência solar, a baixa radiação solar (neste caso 50%) pode possivelmente inibir a síntese de timol, estimulando a produção de carvacrol.

Relatos da literatura demonstram que o o-cimeno é um precursor do timol, o que reduz a quantidade de moléculas, pois são convertidas em timol. O terpeno γ -terpineno é comum na espécie *T. vulgaris* e quantidades razoáveis são sempre relatadas na literatura, assim como o terpeno éter metílico de isotimol [37].

No caso da clorofila, o metabolismo foliar já está bem estabelecido, mesmo em quantidades intermediárias de incidência de luz. A produção de maiores teores de clorofila em menores níveis de incidência solar pode estar associada ao mecanismo de adaptação da espécie em ambientes sombreados, como forma de maximizar a captação de luz. Esse resultado é consistente com a proposição de Taiz et al. [38], que afirmam que plantas submetidas ao cultivo em locais sombreados sintetizam maior quantidade de clorofila por centro de reação.

Em relação à porcentagem de óleo essencial (POE), os maiores rendimentos foram obtidos sob pleno sol e também sob 50% de sombreamento. De acordo com Nielsen et al. [39] e Honorato et al. [40], o desenvolvimento da espécie estimula o crescimento dos estômatos da planta, garantindo maior produção de óleo essencial. Isso está diretamente associado à incidência de luz, seja em maior ou intermediária quantidade.

O parâmetro morfológico diâmetro do caule foi obtido em maior proporção a pleno sol. Para a matéria fresca, os maiores valores foram obtidos a pleno sol e 50% de sombreamento. Em relação à altura, as diferenças obtidas para o cultivo a pleno sol e sombreamento de 50% e 100% foram muito pequenas. Apenas o cultivo a 70% de sombreamento apresentou resultados inferiores. Sob esta percentagem de sombreamento, a matéria fresca e a percentagem de óleos essenciais também foram baixas.

De acordo com Gomes et al. [41], os parâmetros morfológicos são os maiores indicadores do desenvolvimento das mudas, caracterizando de forma padronizada a qualidade do crescimento da espécie com base na altura, diâmetro do caule, relação altura/diâmetro, massa do caule, da raiz e total. Além disso, tais parâmetros estão associados a fatores genéticos e condições ambientais.

De acordo com os resultados apresentados na PCA, as PC1 e PC2 juntas concentram 77,05% da variância total dos dados, demonstrando que grande parte da variabilidade dos dados está concentrada nas duas primeiras PCs, gerando estimativas confiáveis. A PC1 descreve 42,23% da variância total e é explicada pelas variáveis o-cimeno, γ -terpineno, éter metílico de isotimol, timol, carvacrol, clorofila total, altura e OETr de óleo essencial. A PC2 descreve 34,82% da variância total e as variáveis alfa-pineno, beta-mirceno, linalol, diâmetro do caule e matéria fresca são explicadas nesta PC.

A PC3 tem pouca contribuição para a variância total dos dados e descreve apenas as variáveis alfa-tujeno e octen-3-ol. Vale ressaltar que o tamanho do vetor associado ao alfa-tujeno é muito pequeno, ou seja, apresenta uma carga muito próxima da origem do sistema cartesiano. Assim, esse vetor representa pouca importância na descrição do comportamento dos dados.

A **Tabela 2.** apresenta a importância de cada atributo na variância dos dados para os três primeiros PCs. A variável com valor de correlação acima de 0,6 (destacada em negrito na tabela) foi considerada com contribuição significativa. Os compostos hidrato de cis-sabeno e óxido de cariofileno não foram incluídos na PCA devido a critérios de Homogeneidade dos dados.

Tabela 2. Valores dos coeficientes de correlação gerados em relação a cada variável distribuída em cada componente principal (CP)

Compostos	PC1	PC2	PC3
Alfa-tujeno	-0.1010	0.05353	0.9934
Alfa-pineno	0.0237	-0.7160	0.6977
1-octen-3-ol	0.2280	0.4558	0.8604
Beta-mirceno	-0.4927	-0.8643	0.1005
O-cimeno	-0.8822	0.4658	0.06925
Y-terpineno	-0.7993	0.5449	0.2535
Linalol	0.2849	-0.6901	0.6653
Éter metílico de isotimol	-0.8630	0.4397	-0.2489
Timol	-0.8104	-0.5027	0.3010
Carvacrol	-0.743405	0.663347	0.085559
Altura	-0.852149	-0.247895	0.460858
Diâmetro da haste	-0.265998	-0.871605	-0.411763
Matéria fresca	-0.669967	-0.679000	-0.300172
Conteúdo de óleo essencial	-0.694327	-0.664831	-0.275518
Clorofila	-0.920952	0.389636	0.005688

3.4. Análise Microbiológica

Os resultados obtidos da análise microbiológica são apresentados na

Erro! Autoreferência de indicador não válida.. Para o OETPS e o OET100, a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) foram determinadas nos ensaios microbiológicos para gram-negativos. *E. Coli* (ATCC 8739), *Salmonella spp.* (CBAM 0015), *P. aeruginosa* (ATCC 25853), e bactérias gram-positivas, *E. Faecalis* (ATTC 31299), *S. Saprophyticus* (ATCC 35552) e *S. Aureus* (ATCC 25921). Em conjunto, nos testes de determinação de

MBC, a ação bactericida foi observada apenas para |OETPS contra *P. Aeruginosa* (ATCC 25853).

Erro! Autoreferência de indicador não válida.- Análise microbiológica de óleos essenciais em tratamentos a pleno sol e 100% de sombreamento.

Bacteria testada	Gram*	CIM (mg·mL ⁻¹)		CBM (mg·mL ⁻¹)	
		OETPS	OET ₁₀₀	OETPS	OET ₁₀₀
<i>Escherichia coli</i> ^a	-	10	2.5	--	--
<i>Salmonella spp.</i> ^b	-	1.25	1.25	--	--
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^c	-	2.5	2.5	5.0	--
<i>Enterococcus faecalis</i> ^d	+	5.0	5.0	--	--
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> ^e	+	5.0	2.5	--	--
<i>Staphylococcus aureus</i> ^f	+	10	5.0	--	--

(-) Gram-negativos; Gram-positivo (+); (--) Nenhuma concentração testada matou as bactérias; Cepas: a(ATCC 8739), b(CBAM 0015), c (ATCC 25853), d(ATCC 31299), e(ATCC 35552), f(ATCC 25921).

A menor concentração inibitória (CIM) foi observada para a bactéria Gram-negativa *Salmonella spp.* em ambos os tratamentos a 1,25 mg·mL⁻¹. Um estudo realizado por Galgano et al. [42] avaliou a atividade inibitória da OET no crescimento de películas bacterianas em *Salmonella spp.* (CBAM 0015), demonstrando a maior atividade antibacteriana em comparação com diferentes classes de antibióticos. Da mesma forma, Yassin et al. [43] avaliaram a atividade contra bactérias do género *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *E. Faecalis* e *Staphylococcus aureus* de origem alimentar, associando a atividade observada à presença de compostos bioactivos no óleo essencial e sugerindo a sua utilização como agente conservante.

Em geral, o OET100 apresentou melhor atividade contra bactérias do que o OETPS, com exceção de *E. faecalis* e *P. aeruginosa*, que apresentaram o mesmo valor de CIM; em relação à atividade bactericida (CBM), apenas o OETPS a apresentou na concentração de 5,0 mg·mL⁻¹.

Em contrapartida, Sateriale et al. [44] afirmam que a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais se deve à presença de um conjunto de monoterpenos, que se difundem pela matriz de exopolissacarídeos, impedindo a extensão de biofilmes bacterianos e interferindo na adesão de proteínas.

Em geral, a atividade antibacteriana dos óleos essenciais não está ligada a um único mecanismo, mas sim a uma série de reacções que envolvem todo o

metabolismo bacteriano. A hidrofobicidade comum aos OEs pode levar à rutura de estruturas bacterianas e ao aumento da permeabilidade em função da incapacidade de separação do OE da membrana celular, o que pode interferir diretamente no metabolismo bacteriano, uma vez que a membrana celular atua como barreira de permeabilidade e é essencial na manutenção do estado energético celular, no transporte de solutos e na regulação metabólica [45].

Ao estudar o efeito de óleos da espécie *T. vulgaris* contra bactérias patogênicas, Nazzaro et al. [46] estabeleceram que a atividade atribuída está ligada à composição química e à estrutura molecular como fator diferencial. No estudo citado, os autores destacam que o Carvacrol e o Timol têm actividades antibacterianas semelhantes com propriedades proeminentes de desintegração da membrana externa. Em consenso, o estudo realizado por Boukhatem et al. [47] relaciona a ação antibacteriana com a presença de monoterpenos oxidados.

A pesquisa de Dauqan e Abdullah [48] aponta a presença dos fenólicos timol e hidrocarbonetos terpênicos como os principais responsáveis e aborda o efeito sinérgico como o principal responsável pela ação contra as bactérias, efeito esse superior aos seus constituintes principais ou às suas misturas. Outros estudos também relacionam o potencial antibacteriano com a composição química do óleo essencial de *Thymus vulgaris* em bactérias [49-52].

A atividade bactericida encontrada apenas no OETPS neste estudo possivelmente está relacionada aos componentes químicos deste tratamento que intensificaram o efeito sinérgico, com a ação do timol, composto com ação antibacteriana reconhecida na literatura científica.

4. CONCLUSÃO

Os resultados mostraram valores mais elevados com os tratamentos a 50% e a pleno sol para as variáveis matéria fresca, diâmetro do caule e teor de óleo essencial. A espécie é originária de países de clima temperado. Foi cultivada na região do ecótono em uma área de transição entre a zona da mata e a caatinga. A presença de luz favoreceu o ganho de matéria fresca, o diâmetro do caule e o teor de óleo essencial, bem como a síntese do constituinte químico majoritário timol. O resultado relatado também pode demonstrar a complexa

quimiotaxia do gênero e a suscetibilidade às variações dos fatores edafoclimáticos.

A metodologia de quantificação por FRR é demonstrada como uma alternativa prática em medições quantitativas de constituintes de óleos essenciais, pois utilizando um padrão interno, avalia-se a interferência da matriz, sem a necessidade de uma curva de calibração.

Assim, conclui-se que níveis com maior presença de luz favoreceram o teor de óleo essencial e o enriquecimento da composição química da espécie aromática *Thymus vulgaris* em condições controladas de cultivo.

A atividade microbiológica do OET100 e do OETPS foi avaliada, mostrando potencial de inibição, sendo a ação antibacteriana exclusiva do OETPS.

A análise de componentes principais foi muito útil para observar como a incidência de luz contribui para a composição química e o desenvolvimento do *Thymus Vulgaris L.* Os dois PCs principais concentraram 77,05% da variância total dos dados.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - número de bolsa 307904/2022-9).

5. REFERÊNCIAS

- [1] E. Stahl-Biskup, R.P. Venskutonis, 27 - Thyme, Editor(s): K.V. Peter, In Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Handbook of Herbs and Spices (Second Edition), Woodhead Publishing (2012) 499-525, <https://doi.org/10.1533/9780857095671.499>.
- [2] A.K Al-Asmari, M.d Tanwir Athar, A.A Al-Faraidy, M.S Almuhaiza, Chemical composition of essential oil of *Thymus vulgaris* collected from Saudi Arabian market, Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 7, 147-150 (2017) 2221-1691, <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.11.023>.
- [3] L. A. S. Pereira, P.C, Silva, J. P Pagnossa, K. W. E Miranda, E. S Medeiros, R. H. Piccoli, J. E de Oliveira, , Antimicrobial zein coatings plasticized with garlic and thyme essential oils, Brazilian Journal of Food Technology 22 (2019) 2018135, <https://doi.org/10.1590/1981-6723.13518>
- [4] A.A Arpanahi, M. Feizian, G. Mehdipourian, N.D. Khojasteh, Arbuscular mycorrhizal fungi inoculation improve essential oil and physiological parameters and nutritional values of thymus daenensis celak and *Thymus Vulgaris* L. Under normal and drought stress conditions. European journal of soil biology 100 (2020) 103217, <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2020.103217> .
- [5] M. Moghaddam, L. Mehdizadeh, Chemical composition and antifungal activity of essential oil of *thymus vulgaris* grown in Iran against some plant pathogenic fungi. Journal of essential oil bearing plants 2 35 (2020) 1072–1083, <https://doi.org/10.1080/0972060x.2020.1843547>.
- [6] M. Moazeni, A. Davari, S. Shabanzadeh, J. Akhtari, M. Saeedi, K. Mortyeza-semnani, M. Abastabar, M. Nabili, H.F Moghadam, B. Roohi, H. Kelidari, A. Nokhodchi, In vitro antifungal activity of *thymus vulgaris* essential oil nanoemulsion, Journal of herbal medicine 28 (2021), 100452, <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2021.100452> .
- [7] M.A Donegá, G. Ferezini, C.S mello, K. Minami, R.S Silva, Recipientes e substratos na produção de mudas e no cultivo hidropônico de tomilho (*thymus vulgaris* L.), Revista brasileira de plantas medicinais, v. 16, (2014), 271–274, <https://doi.org/10.1590/s1516-05722014000200016> .

- [8] A. A Ghaderi, B. Fakheri, M.N Nezhad, Evaluation of the morphological and physiological traits of thyme (*thymus vulgaris* L.) Under water deficit stress and foliar application of ascorbic acid. Journal of crops improvement .19 (2018) 1- 4, <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20193463474> .
- [9] M.F Lourenço, Metodologia do teste de envelhecimento acelerado em sementes de tomilho (*thymus vulgaris* L.) E mini tomate (*solanum lycopersicum* var. *Cerasiforme*) (2018), <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/153260>.
- [10] H. A Barichello, R.Stefanello, G. G. Bastiani, , L. A. S. Das Neves, Effect of salt stress on germination and initial development of Ruta graveolens L. Hoehnea. 48, (2021) 1202020, <https://doi.org/10.1590/2236-8906-120/2020>.
- [11] R. M Pimentel, G.F.V Bayão, D.L Lelis, A.J Cardoso F.V Saldarriaga,C.C.V Melo, F.B Souza, A.C Pimentel, D.M Fonseca, M.E.R Santos, Ecofisiologia de plantas forrageiras, Pubvet .10 (2016) 636–720, <https://doi.org/10.22256/pubvet.v10n9.666-679> .
- [12] H. Pinheiro, L. Giacomini, I. Reis, L . Baratto, Avaliação do desenvolvimento e da produção de flavonoides de kalanchoe pinnata (lam.) Pers. (crassulaceae) em diferentes condições de luz e nutrição, Revista fitos 10 (2017), <https://doi.org/10.5935/2446-4775.20160029> .
- [13] N. Cruz, A. Pires, D. Fries, R. Jardim, B. Sousa, D. Dias, P. Bonomo, B. Ramos, M. Sacramento, Fatores que afetam as características morfogênicas e estruturais de plantas forrageiras, Research, society and development, . 10 (2021) 5410716180, <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i7.16180> .
- [14] A.J.M Campos, M.S Santos, I.R.F.F Nacarath, Estresse hídrico em plantas: uma revisão, Research, society and development . 10 (2021) e311101523155, <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i15.23155>.
- [15] T.R.G Silva, M.L.A Costa, L.R.A Farias, M.A Santos, J.J.L Rocha, J.V Silva, Fatores abióticos no crescimento e florescimento das plantas, Research, Society and Development. 10 (2021) 19710413817, <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i4.13817> .
- [16] L. Galovičová, P. Borotová, V. Valková, N.L. Vukovic, M. Vukic, J. Štefániková, H. Ďúranová, P.Ł. Kowalczewski, N. Čmiková, M.

Kačániová, *Thymus vulgaris* Essential Oil and Its Biological Activity. *Plants* 2021. 10 (2021) 1959, <https://doi.org/10.3390/plants10091959>

[17] R. Pavela, P. Sedlák, Post-application temperature as a factor influencing the insecticidal activity of essential oil from *Thymus vulgaris*, *Industrial Crops and Products* . 113 (2018) 46–49, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.01.021>.

[18] K. Kucharska-Ambrożej, J. Karpinska, The application of spectroscopic techniques in combination with chemometrics for detection adulteration of some herbs and spices, *Microchem. J.* 153 (2020) 104278, <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104278>.

[20] H. Ali-Arab, F. Bahadori, M. Mirza, H.N. Badi, S. Kalate-Jari, Variability in essential oil composition and phenolic acid profile of *Thymus daenensis* Celak. populations from Iran, *Ind. Crops. Prod.* 178 (2022) 114345, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114345>

[21] M. Nutrizio, G. Pataro, D. Carullo, S. Carpentieri, L. Mazza, G. Ferrari, F. Chemat, M. Banović, A.R. Jambrak, High Voltage Electrical Discharges as an Alternative Extraction Process of Phenolic and Volatile Compounds from Wild Thyme (*Thymus serpyllum* L.): In Silico and Experimental Approaches for Solubility Assessment, *Molecules* 25 (2020) 4131, <https://doi.org/10.3390/molecules25184131>.

[22] R.M.A Assis, J.H Chagas, J.J Leite, J.P Santos, S.K.V Bertolucci, J.E.B.P Pinto, Effect of irradiance levels on biomass production, essential oil content and anatomy of *Artemisia alba* Turra, *Research, Society and Development* . 11 (2022) e377111335565, <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i13.35565>.

[23] L.L.N Araújo, H.C Melo, J.R PAULA, F.R.R ALVES, T.A PORTES, Yield and Composition of the Essential oil of *Tetradenia riparia* (Hochst) Codd (Lamiaceae) Cultivated Under Different Shading Levels, *Planta Daninha* .36 (2018) e018164745, , <https://doi.org/10.1590/S0100-83582018360100066>.

[24] L. Milenković, Z.S Ilić, L. Šunić, N. Tmušić, L. Stanojević, D. Cvetković, Modification of light intensity influence essential oils content, composition and antioxidant activity of thyme, marjoram and oregano, *Saudi Journal of Biological Sciences* . 28 (2021) 6532–6543, <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.07.018>

- [25] Z. S Ilić, L. Milenković, L. Stanojević, B. Danilović, L. Šunić, A. Milenković, Ž . Kevrešan, J. Stanojević, D. Cvetković, Phytochemical composition and antimicrobial activities of the essential oils from summer savory (*Satureja hortensis* L.) growing in shading condition, *Journal of Essential Oil Bearing Plants* . 26 (2023) 1397–1409, <https://doi.org/10.1080/0972060X.2023.2289055> .
- [26] Inmet. Instituto nacional de meOETrologia, <http://www.inmet.gov.br>.
- [27] J.J.F. Clevenger, Apparatus for the Determination of Volatile Oil, *The Journal of the American Pharmaceutical Association*.12 (1928) 345-349, <https://doi.org/10.1002/jps.3080170407> .
- [28] T. Cachet, H. Brevard, A. Chaintreau, J. Demyttenaere, L. French, K. Gassenmeier, D. Joulain, T. Koenig, H. Leijs, P. Liddle, G Loesing, M. Marchant, P.H Merle, K. Saito, C. Schippa, F. Sekiya, T. Smith, IOFI recommended practice for the use of predicted relative-response factors for the rapid quantification of volatile flavouring compounds by GC-FID: IOFI recommended practice - use of predicted relative-response factors, *Flavour and Fragrance Journal* . 31 (2016) 191–194, <https://doi.org/10.1002/ffj.3311> .
- [29] E. Tissot, S. Rochat, C. Debonneville, A. Chaintreau, Rapid gc-fid quantification technique without authentic samples using predicted response factors, *Flavour and fragrance journal* . 27 (2012), 290–296, <https://doi.org/10.1002/ffj.3098.7>
- [30] CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Clinical and Laboratory Standards Institute, Document M7-A6, Wayne. 2003
- [31] D. Lalević, Z. S.ilić, L. Stanojević, L. Milenković, L. Šunić, R. Kovač, D. Kovačević, B. Danilović, A. Milenković, J. Stanojević, D. Cvetković, Shade-Induced Effects on Essential Oil Yield, Chemical Profiling, and Biological Activity in Some Lamiaceae Plants Cultivated in Serbia, *Horticulturae* .9 (2023) 84 <https://doi.org/10.3390/horticulturae9010084> .
- [32] P. R. M. Correia, M. M. C. Ferreira, Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para

tratamento de dados analíticos, Química Nova. 30 (2007) 481, <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200042>.

[33] A. S. Souza, M. A. Bezerra, U.M. F. M Cerqueira, C J. O. Rodrigues; B. C. Santos, C. G. Novaes, E. R. V. Almeida, Food Science and Biotechnology. 33 (2024) 1323-1336, <https://doi.org/10.1007/s10068-023-01509-5>.

[34] G. J. A. Hernández, H. Y. O. Macias, R. I. L Román, O. A. C. Hernández, A. R. Sahagún, Aislamiento y clonación parcial de un gen de terpeno sintasa de orégano mexicano (*Lippia graveolens* Kunth), Biotecnología y Sustentabilidad. 3 (2018) 10–10, <https://doi.org/10.57737/biotecnologiaysust.v3i2.500> .

[35] D.F.M NETO, Domingos Ferreira de. Análise metabolômica aplicada a dois genótipos de pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.) com níveis contrastantes de ésteres de forbol Tese (Doutorado em Agronomia/ Fitotecnia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2023, <http://repositorio.ufc.br/handle/riufc/72627>.

[36] S. T Krause, P. Liao, C. Crocoll, B. Boachon, C. Förster, F. Leidecker, N. Wiese, Zhao, J. C. Wood, C. R. Buell, J. Gershenzon, N. Dudareva, J. Degenhardt, The biosynthesis of thymol, carvacrol, and thymohydroquinone in *Lamiaceae* proceeds via cytochrome P450s and a short-chain dehydrogenase, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 118 (2021) e2110092118, <https://doi.org/10.1073/pnas.2110092118> .

[37] Z. S. Carvalho, R. N. Souza, J. J. Moreira, S. Teles, J. A pereira, F. Silva, Atividade antifúngica do óleo essencial de *Lippia alba* em *Aspergillus welwitschiae*, Magistra, .33 (2023), <https://www3.ufrb.edu.br/index.php/magistra/article/view/4436>

[38] L.Taiz, E. Zeiger, I. M Moller, A. Murphy, Fisiologia e desenvolvimento vegetal .6 Porto Alegre, (2017).

[39] J. A. Nielsen, E. Grøndahl, R. M. Callaway, K. J. M. Dickinson, B. K. Ehlers, Home and away: biogeographical comparison of species diversity in *Thymus vulgaris* communities, Biological Invasions .19 (2017) 2533–2542, <https://doi.org/10.1007/s10530-017-1461-x>.

- [40] A.C. Honorato, G. A. Nohara, R. M. A. Assis, J. F. A. Maciel, A. A. Carvalho, J. E. B. P. Pinto, S. K. V. Bertolucci, Colored shade nets and different harvest times alter the growth, antioxidant status, and quantitative attributes of glandular trichomes and essential oil of *Thymus vulgaris* L, Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants .35 (2023) 100474, <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2023.100474> .
- [41] S. H. M. Gomes, F. B. Gonçalves, R. A. Ferreira, F. R. M. Pereira, M. M. J. Ribeiro, Avaliação dos parâmetros morfológicos da qualidade de mudas de *Paubrasilia echinata* (pau-brasil) em viveiro florestal, Scientia Plena. 15 (2019), <https://doi.org/10.14808/sci.plena.2019.011701>.
- [42] M. Galgano, D. Mrenoshki, F. Pellegrini, L. CAPOZZI, M. CORDISCO, L. Del Sambro, A. Trotta, M. Camero, M. Tempesta, D. Buonavoglia, P. Laricchiuta, C. Catella, A. Pratelli, A. Buonavoglia, M. Corrente, Antibacterial and Biofilm Production Inhibition Activity of *Thymus Vulgaris* L. Essential Oil against *Salmonella* spp. Isolates from Reptiles, Pathogens .12 (2023) 804, <https://doi.org/10.3390/pathogens12060804> .
- [43] M. T Yassin, A. A.F Mostafa, , A. A. Al-askar, s. R. M. sayed, In vitro antimicrobial activity of *thymus vulgaris* extracts against some nosocomial and food poisoning bacterial strains, Process biochemistry .115 (2022), 152–159 <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.02.002> .
- [44] D. Sateriale, G. Forgione, G. A. Cristofaro, C. Pagliuca, R. Colicchio, P. Salvatore, M. Paolucci, C. Pagliarulo, Antibacterial and antibiofilm efficacy of thyme (*Thymus Vulgaris* L. Essential oil against foodborne illness pathogens, *salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar *typhimurium* and *bacillus cereus*, Antibiotics . 12 (2023) 485, <https://doi.org/10.3390/antibiotics12030485>.
- [45] F. Reyes-jurado, T. Cervantes-rincón, H. Bach, A. López-malo, E. Palou, Antimicrobial activity of mexican oregano (*lippia berlandieri*), thyme (*Thymus vulgaris* L), and mustard (*brassica nigra*) essential oils in gaseous phase, Industrial crops and products .131 (2019), 90–95 <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.01.036> .

- [46] F. Nazzaro, F. Fratianni, L. Martino, R. Coppola, V. Feo, Effect of essential oils on pathogenic bacteria, *Pharmaceuticals* .6 (2013) 1451–1474, <https://doi.org/10.3390/ph6121451> .
- [47] M. N. Boukhatem, N. H. E. Darwish, T. Sudha, S. Bahlouli, D. Kellou, A. B. Benelmouffok, H. Chader, M. Rajabi, Y. Benali, S. A. Mousa, In Vitro Antifungal and Topical Anti-Inflammatory Properties of Essential Oil from Wild-Growing *Thymus vulgaris* (Lamiaceae) Used for Medicinal Purposes in Algeria: A New Source of Carvacrol, *Scientia Pharmaceutica* . 88 (2020) 33, <https://doi.org/10.3390/scipharm88030033> .
- [48] E. M. A. Dauqan, A. Abdullah, Medicinal and functional values of thyme (*thymus vulgaris* L.) Herb, *Journal of applied biology and biotechnology* .5 (2017) 017–022, <https://doi.org/10.7324/jabb.2017.50203> .
- [49] A. A Khan, S.M. S. Amjad, Gc-ms analysis and biological activities of *Thymus vulgaris* and *mentha arvensis* essential oil, *Turkish journal of biochemistry* . 44 (2019) 388–396, <https://doi.org/10.1515/tjb-2018-0258> .
- [50] q. Benameur,; T. Gervasi, V. Pellizzeri, M. Pluchtová,; H. Tali-maama,; F. Assaous, B. Guettou, K. Rahal, D. Grul'ová, G. Dugo, A. Marino, M.H Ben-mahdi, Antibacterial activity of *Thymus vulgaris* essential oil alone and in combination with cefotaxime against bla_{esbl} producing multidrug resistant enterobacteriaceae isolates. *Natural product research* .33 (2019) 2647–2654, <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1466124>
- [51] M. H. Labiad, W. Belmaghraoui, A. Ghanimi, C. El-guezzane, N. Chahboun, H. Harhar, C. Egea-gilabert, A. Zarrouk, M. Tabyaoui, Biological properties and chemical profiling of essential oils of *thymus* (*vulgaris*, *algeriensis* and *broussonettii*) grown in morocco, *Chemical data collections* .37 (2022) 100797, <https://doi.org/10.1016/j.cdc.2021.100797> .
- [52] R. M. Alkufeidy, D. A. Al farraj,; R. M. Aljowaie, M. A. Ali, M. S. Elshikh, Chemical composition of *Thymus Vulgaris* extracts and antibacterial activity against pathogenic multidrug resistance bacteria, *Physiological and molecular*

plant pathology . 117 (2022) 101745,
<https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2021.101745>

Material Suplementar

Composição química e potencial microbiológico do óleo essencial de
Thymus Vulgaris L. cultivado sob diferentes níveis de sombreamento

Mateus S. Porto^a, Rubens S. Barreto^{c,d}, Yane N. Valadares^b, Cleber G.
Novaes^a, Djalma M. de Oliveira^a, Bárbara A. Dutra^b, Hion O. de Jesus^e, Simone A.
Gualberto^b, Rosane M. Aguiar^{a*}

^a Departamento de Ciências e Tecnologias, Universidade Estadual do
Sudoeste da Bahia, 45208-091, Jequié-BA, Brazil.

^b Departamento Ciências Exatas e Naturais, Universidade Estadual do
Sudoeste da Bahia, 45700-000 Itapetinga-BA, Brazil.

^c Departamento de Ensino, Instituto Federal de Educação, Ciência e
Tecnologia da Bahia, 45201-767, Jequié-BA, Brazil.

^d Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais,
Universidade Estadual de Feira de Santana, 44036-900, Feira de Santana-BA,
Brazil.

^eInstituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Campus Ondina,
40170-280 Salvador – BA, Brazil.

*rosaneaguiar@uesb.edu.br (corresponding author)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9803-8183>

27
28

Tabela S1. Análise analítica dos principais constituintes químicos quantificados para óleo essencial de *T. vulgaris* cultivado em nível sombreado sem tela (OETPS)

						RRF	RRF	SEM RRF	SEM RRF
Ordem de eluição	Constituintes Químicos	Fórmula molecular	IK Calc	IK Literatura	RRF _{Calc}	Massa (mg)	Massa (%)	Massa (mg)	Massa (%)
SI	Geraniol	C ₁₀ H ₁₈ O	-	-	-	0.250 ⁽⁴⁾	2.304	0.250	2.304
1	α-thujanol	C ₁₀ H ₁₆ O	928	924	0.910	0.021	0.194	0.023	0.212
2	α-Pinene	C ₁₀ H ₁₆	926	932	0.784	0.064	0.590	0.082	0.756
3	1-octen-3-ol	C ₈ H ₁₆ O	976	974	0.916	0.017	0.157	0.018	0.166
4	β-myrcene	C ₁₀ H ₁₆	981	990	0.784	0.102	0.940	0.130	1.199
5	O-cymene	C ₁₀ H ₁₄	1051	1040	0.799	0.118	1.088	0.148	1.364
6	γ-terpinene	C ₁₀ H ₁₆	1059	1062	0.784	0.038	0.350	0.049	0.452
7	Linalool	C ₁₀ H ₁₈ O	1091	1096	0.891	0.241	2.221	0.271	2.498
8	Isothymol methyl ether	C ₁₁ H ₁₆ O	1289	1235	0.819	0.027	0.248	0.033	0.304
9	Thymol	C ₁₀ H ₁₄ O	1298	1290	0.829	3.208	29.567	3.868	35.650
10	Carvacrol	C ₁₀ H ₁₄ O	1301	1299	0.829	0.043	0.396	0.052	0.479
Massa total de identificados	-	-	-	-	-	4.130	-	4.923	-

Massa total de não identificados	-	-	-	-	-	6.470	-	5.677	-	
Massa total	-	-	-	-	-	10.850	-	10.850	-	
Massa de amostra	-	-	-	-	-	10.600	-	10.600	-	

IK: Índice de Kovats; RRF: Quantificação utilizando os Fatores de Resposta Relativa; SI = Norma Interna; OETPS: Óleos Essenciais de T. vulgaris (Pleno Sol).

43
44

Tabela S2. Análise analítica dos principais constituintes químicos quantificados para óleo essencial de *T. vulgaris* cultivado em nível de sombreamento de tela 50% (OET50).

						RRF	RRF	SEM RRF	SEM RRF
Ordem de eluição	Constituintes Químicos	Fórmula molecular	IK Calc	IK Literatura	RRF _{Calc}	Massa (mg)	Massa (%)	Massa (mg)	Massa (%)
SI	Geraniol	C ₁₀ H ₁₈ O	-	-	-	0.250	2.370	0.250	2.370
1	β-mirceno	C ₁₀ H ₁₆	981	990	0.784	0.061	0.578	0.078	0.739
2	O-cimeno	C ₁₀ H ₁₆	1046	1040	0.784	1.523	14.436	1.941	18.398
3	γ-terpineno	C ₈ H ₁₆ O	1060	1062	0.916	0.464	4.398	0.507	4.806
4	Linalol	C ₁₀ H ₁₆ O	1070	1070	0.910	0.026	0.246	0.059	0.559
5	Bornéol	C ₁₀ H ₁₄	1090	1096	0.799	0.097	0.919	0.121	1.147
6	4-terpineol	C ₁₀ H ₁₆			0.784	0.059	0.559	0.075	0.711
7	Éter metílico de isotimol	C ₁₀ H ₁₈ O	1234	1235	0.891	0.139	1.317	0.155	1.469
8	Timol	C ₁₁ H ₁₆ O	1299	1290	0.819	3.149	29.848	3.846	36.455
9	Carvacrol	C ₁₀ H ₁₄ O	1306	1299	0.829	0.180	1.706	0.217	2.057
10	β-cariofileno	C ₁₀ H ₁₄ O	1423	1419	0.829	0.085	0.806	0.102	0.967
Massa total de identificados	-	-	-	-	-	6.033	-	7.351	-

Massa total de não identificados	-	-	-	-	-	4.267	-	2.949	-
Massa total	-	-	-	-	-	10.550	-	10.550	-
Massa de amostra	-	-	-	-	-	10.300	-	10.300	-

IK: Índice de Kovats; RRF: Quantificação utilizando os Fatores de Resposta Relativa; SI = Norma Interna; OET50: Óleos Essenciais de T. vulgaris (50% de sombreamento).

58
59

Tabela S3. Análise analítica dos principais constituintes químicos quantificados para óleo essencial de *T. vulgaris* cultivado em nível de sombreamento de tela 70% (OET70).

						RRF	RRF	SEM RRF	SEM RRF
Ordem de eluição	Constituintes Químicos	Fórmula molecular	IK Calc	IK Literatura	RRF _{calc}	Mass a(mg)	Massa (%)	Massa (mg)	Massa (%)
SI	Geraniol	C ₁₀ H ₁₈ O	-	-	-	0.250	2.415	0.250	2.415
1	1-octen-3-ol	C ₈ H ₁₆ O	982	974	0.784	0.045	0.435	0.049	0.473
2	O-cimeno	C ₁₀ H ₁₄	1045	1040	0.784	0.115	1.111	0.143	1.382
3	γ-terpineno	C ₁₀ H ₁₆	1060	1062	0.916	0.064	0.618	0.081	0.782
4	Hidrato de cis- sabineno	C ₁₀ H ₁₈ O	1071	1070	0.784	0.108	1.043	0.040	0.386
5	Linalol	C ₁₀ H ₁₈ O	1102	1096	0.799	0.086	0.831	0.097	0.937
6	Éter metílico de isotimol	C ₁₁ H ₁₆ O	1234	1235	0.784	0.037	0.357	0.041	0.396
7	Timol	C ₁₀ H ₁₄ O	1308	1290	0.891	1.575	15.217	1.693	16.357
8	Carvacrol	C ₁₀ H ₁₄ O	1306	1299	0.819	0.078	0.754	0.094	0.908
9	β-cariofileno	C ₁₅ H ₂₄	1294	1299	0.829	0.023	0.222	0.031	0.299
10	Óxido de cariofileno	C ₁₅ H ₂₄ O	1424	1419	0.829	0.033	0.319	0.046	0.444
Massa total de identificados	-	-	-	-	-	2.414	-	-	2.566

Massa total de não identificados	-	-	-	-	-	7.686	-	-	7.534
Massa total	-	-	-	-	-	10.350	-	-	10.350
Massa de amostra	-	-	-	-	-	10.100	-	-	10.100

IK: Índice de Kovats; RRF: Quantificação utilizando os Fatores de Resposta Relativa; SI = Norma Interna; OET70: Óleos Essenciais de T. vulgaris (70% de sombreamento).

76
77

Tabela S4. Análise analítica dos principais constituintes químicos quantificados para óleo essencial de *T. vulgaris* cultivado em nível de sombreamento de tela 100% (OET100).

						RRF	RRF	SEM RRF	SEM RRF
Ordem de eluição	Constituintes Químicos	Fórmula molecular	IK Calc	IK Literatura	RRF _{Calc}	Massa a(mg)	Massa (%)	Massa (mg)	Massa (%)
SI	Geraniol	C ₁₀ H ₁₈ O	-	-	-	0.250	2.283	0.250	2.283
1	α-tujeno	C ₁₀ H ₁₆	926	930	0.784	0.061	0.557	0.078	0.712
2	α-pineno	C ₁₀ H ₁₆	933	939	0.784	0.044	0.402	0.057	0.521
3	1-octen-3-ol	C ₁₀ H ₁₆ O	973	974	0.916	0.115	1.050	0.125	1.141
4	β-mirceno	C ₁₀ H ₁₈ O	1007	998	0.784	0.039	0.356	0.050	0.457
5	O-cimeno	C ₁₀ H ₁₄	1056	1040	0.799	1.105	10.091	1.382	12.621
6	γ-terpineno	C ₁₀ H ₁₆	1059	1060	0.784	0.447	4.082	0.570	5.205
7	Linalol	C ₁₀ H ₁₈ O	1101	1096	0.891	0.174	1.589	0.195	1.781
8	Éter metílico de isotimol	C ₁₀ H ₁₄ O	1240	1235	0.819	0.074	0.676	0.090	0.822
9	Timol	C ₁₀ H ₁₄ O	1298	1290	0.829	2.932	26.776	3.535	32.293
10	Carvacrol	C ₁₀ H ₁₄ O	1296	1299	0.829	0.157	1.434	0.190	1.735
Massa total de identificados	-	-	-	-	-	5.397	-	5.303	-

Massa total de não identificados	-	-	-	-	-	6.520	-	4.180	-
Massa total	-	-	-	-	-	10.950	-	10.700	-
Massa de amostra	-	-	-	-	-	10.950	-	10.700	-

78
79

IK: Índice de Kovats; RRF: Quantificação utilizando os Fatores de Resposta Relativa; SI = Norma Interna; OET100: Óleos Essenciais de T. vulgaris (100% sombreamento).

CAPÍTULO II

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE OS TESTES DE OETR DE FENÓLICOS
USANDO OS REAGENTES DE FAST BLUE E FOLIN-CIOCALTEAU SOBRE
EXTRATO ETANÓLICO E ÓLEO ESSENCIAL COMERCIAL DE *THYMUS
VULGARIS L.* (LAMIACEAE)**

Comparative study between phenolic content tests using Fast blue and
Folin-Ciocalteu reagents on ethanolic extract and commercial essential oil
of *Thymus Vulgaris L.* (Lamiaceae)

Estudio comparativo entre pruebas de contenido fenólico utilizando los
reactivos Fast blue y Folin-Ciocalteu en extracto etanólico y aceite
esencial comercial de *Thymus Vulgaris L.* (Lamiaceae)

Mateus Sousa Porto
Mestrando em Química
Instituição: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
Endereço: Jequié – Bahia, Brasil
E-mail: mateus.sp95@outlook.com

Yanes Neves Valadares
Mestra em Ciências Ambientais
Instituição: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
Endereço: Itapetinga- Bahia, Brasil
E-mail: yane.neves16@hotmail.com

Rafaela Brito Ribeiro Santos
Mestra em Ciências Ambientais
Instituição: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
Endereço: Itapetinga- Bahia, Brasil
E-mail: xrafa_abritor@hotmail.com

Simone Andrade Gualberto
Doutora em Ciências Farmacêuticas
Instituição : Universidade Federal de Minas Gerais
Endereço: Itapetinga- Bahia, Brasil
E-mail: sagualberto@hotmail.com

Patricia Santos
Graduando em Química
Instituição: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
Endereço: Jequié- Bahia, Brasil
E-mail: Patty19saanthos@gmail.com

Rosane Moura Aguiar
Doutora em Química
Instituição: Universidade Federal da Bahia
Endereço: Jequié- Bahia, Brasil
E-mail: rosaneaguiar@uesb.edu.br

RESUMO

Os óleos essenciais e extratos vegetais têm se tornado foco de estudos e interesse da comunidade científica, principalmente na área farmacêutica, onde a busca por fitoterápicos de ampla utilidade torna-se crucial. Muitas das espécies vegetais endêmicas e exóticas são importantes produtoras de óleos essenciais. Essas espécies têm contribuído de maneira importante para as indústrias, principalmente como aditivos em alimentos e em aplicações terapêuticas. Esse trabalho teve por objetivo traçar um comparativo sobre a composição de fenólicos totais, das partes aéreas de *Thymus vulgaris* L. e seu óleo essencial comercial, avaliada pelos métodos de Folin Ciocalteu e Fast blue. O óleo essencial foi adquirido em loja comercial e o material vegetal coletado na cidade de Itapetinga - BA. Observou-se um elevado teor de fenólicos totais para o extrato bruto, Folin Ciocalteu ($12,561 \pm 0,005$ g EAG.100 g⁻¹) e Fast blue ($12,713 \pm 0,037$ g EAG.100 g⁻¹), para o óleo essencial Folin Ciocalteu ($4,95 \pm 0,23$ g.100 g⁻¹) e Fast blue ($5,65 \pm 0,18$ g.100 g⁻¹) os valores foram provavelmente relacionada ao timol e ao carvacrol, os constituintes majoritários presentes na amostra.

Palavras-chave: Folin Ciocalteu , Fast blue, Fenólicos, *Thymus vulgaris*.

ABSTRACT

Essential oils and plant extracts have become the focus of study and interest in the scientific community, especially in the pharmaceutical field, where the search for widely useful phytotherapies has become crucial. Many endemic and exotic plant species are important producers of essential oils. These species have made an important contribution to industries, mainly as additives in food and in therapeutic applications. The aim of this study was to compare the total phenolic composition of the aerial parts of *Thymus vulgaris* L. and its commercial essential oil, assessed using the Folin Ciocalteu and Fast blue methods. The essential oil was purchased from a commercial store and the plant material was collected in the city of Itapetinga - BA. A high content of total phenolics was observed for the crude extract, Folin Ciocalteu (12.561 ± 0.005 g EAG.100 g⁻¹) and Fast blue (12.713 ± 0.037 gEAG.100 g⁻¹), for the essential oil Folin Ciocalteu (4.95 ± 0.23 g.100 g⁻¹) and Fast blue (5.65 ± 0.18 g.100 g⁻¹) the values were probably related to thymol and carvacrol, the majority constituents present in the sample.

Keywords: Folin Ciocalteu , Fast blue, Fenólicos, *Thymus vulgaris*

INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais (OEs) são metabólitos secundários formados por compostos voláteis e semivoláteis, produzidos por mais de 17.500 espécies de plantas e armazenados em diferentes órgãos vegetais, como folhas, frutos, flores, raízes e sementes. Esses óleos possuem uma composição química complexa, que inclui diversas classes orgânicas, como hidrocarbonetos, fenóis, álcoois, cetonas e aldeídos, e geralmente são extraídos por hidrodestilação, o método mais comum (Santos, 2022).

Estudos vêm sendo conduzidos para identificar, detectar e quantificar os compostos bioativos presentes nos OEs, assim como para compreender suas propriedades fitoterápicas (Menezes et al., 2018; Pombo et al., 2018; Lima; Pinheiro; Barros; Barros, 2021), com o objetivo de desenvolver alternativas para o tratamento de diversas doenças, beneficiando em especial populações em situação de vulnerabilidade socioeconômica, além do incentivar a exploração dos recursos naturais promovendo o uso sustentável e a preservação de ecossistemas.

A bioatividade dos óleos essenciais (OEs) e dos extratos botânicos (EBs) está diretamente ligada às características da espécie vegetal utilizada, visto que ambos são obtidos por métodos específicos de extração. Para a extração de óleo essencial, a hidrodestilação é o método mais amplamente utilizado, onde partes da planta, como ramos ou a planta inteira, são submetidas ao arraste a vapor em condições controladas de temperatura e pressão, possibilitando a extração dos compostos voláteis (Castilhos; Felisbino; Rodrigues, 2021).

Por outro lado, os extratos brutos são geralmente obtidos por extração com solventes orgânicos de polaridades específicas, permitindo o fracionamento e a extração de classes de compostos distintos conforme a polaridade do solvente (Souza; Gasparoti; de Paula, 2022). Assim, o uso de métodos de extração variados permite a obtenção de compostos com propriedades e potenciais bioativos diversos, ampliando as possibilidades de aplicação dos produtos finais.

Entre os compostos bioativos, os fenólicos se destacam pela ampla variedade de bioatividade, incluindo atividades antibacteriana, antifúngica,

antioxidante, antiparasitária e citotóxica. Nas plantas, esses compostos atuam como agentes protetores contra patógenos e outros fatores externos, além de oferecerem proteção contra a radiação ultravioleta (Penarrieta et al., 2014; Hister et al., 2017; Deus et al., 2019). Nos alimentos, desempenham um papel importante nas características sensoriais, como cor e sabor, além de atuarem como potentes antioxidantes (Guerra et al., 2016), e na saúde humana, oferecem inúmeros benefícios, que vão desde a anti-inflamatórias, analgésicas e neuroprotetoras, prevenção de doenças cardiovasculares, auxiliam na perda de peso e na redução dos níveis de glicose sanguíneo (Leal et al., 2017; Fernandes, 2019).

Uma espécie que vem despertando interesse científico é a espécie *Thymus Vulgaris L*, conhecida popularmente como tomilho, é uma erva perene do Mediterrâneo amplamente utilizada na culinária. Pertencente à família *Lamiaceae*, apresenta-se como um subarbusto de 15 a 30 cm de altura, com ramos lenhosos de coloração verde a cinza, folhas pequenas e lanceoladas de tonalidade lilás e flores que surgem em pequenos cachos, principalmente na primavera (Hosseinzadeh et al., 2015; Kuete, 2017).

Dentre os componentes do óleo essencial de tomilho, o timol e o carvacrol são os compostos majoritários encontrados em diversos estudos (Rocha et al., 2012; Liu et al., 2021). O timol é um composto fenólico presente como constituinte majoritário em diversos quimiotipos de tomilho e possui atividades biológicas constatadas, entre elas, a ação antibacteriana (Wang et al., 2017). Ambos contribuem para suas propriedades terapêuticas, com usos no tratamento de infecções respiratórias, problemas digestivos e inflamações. No entanto, estudos voltados para a elucidação do mecanismo antimicrobiano nas células ainda vêm sendo realizados e estimulado cada vez mais a investigação das propriedades do timol frente à diversos organismos (Khallil. et al, 2018; Kachura & Suntres, 2020a;).

Recentemente, o uso do óleo essencial da *T. vulgaris* tem se destacado como recurso alternativo na terapia de pacientes acometidos pelo vírus SARS-CoV-2 (Khan, et al., 2019a; Catella et al., 2021), reforçando a necessidade de que mais estudos sejam desenvolvidos (Sadaria et al., 2021).

A avaliação do potencial botânico de espécies por meio de metodologias espectrofotométricas tem se mostrado uma ferramenta valiosa para a análise química. Essas metodologias utilizam reagentes químicos específicos para identificar e quantificar os componentes presentes na matriz vegetal e seus subprodutos. No caso dos compostos fenólicos, os reagentes Salt Fast Blue B e Folin-Ciocalteu são amplamente empregados para a detecção e quantificação de fenólicos totais, permitindo mensurar a bioatividade dos constituintes químicos das espécies (Moises et al., 2021; Oliveira et al., 2023; Maia et al., 2024).

A interpretação composição química está intimamente ligada à compreensão dos mecanismos de ação farmacológica, o que contribui para resultados mais precisos e confiáveis. No entanto, ainda são escassos na literatura estudos que busquem explorar e esclarecer em profundidade esses mecanismos químicos, evidenciando a necessidade de maiores investigações nesse campo (Soares et al., 2016).

Diante do exposto, esta pesquisa teve como objetivo avaliar o OETr de fenólicos totais no extrato bruto, das partes aéreas e no óleo essencial comercial da espécie *Thymus Vulgaris*, estabelecendo uma análise comparativa entre os testes Fast Blue e Folin-Ciocalteu.

1. MATERIAL E MÉTODOS

O OE de *T. vulgaris* foi obtido de casa comercial (OEC), especializada na venda de produtos naturais. Sendo aquisição, uma indicação da marca de maior frequência de consumo da loja. O material vegetal utilizado neste estudo foi coletada sob as coordenadas latitude 15°15'16.61 "S e longitude 40°16'26.14 "W, no período de agosto/2022 a março/2023, cujo clima é tropical úmido com uma estação seca, segundo a classificação de Koppen; regiões com essa característica climática apresentam faixas de precipitação pluviométrica entre 750 e 1800 mm/ano, e temperatura entre 20 e 29°C(INMET, 2022).

As partes aéreas foram separadas para secagem em estufa de circulação de ar forçada, com temperatura de 50 °C, de 10 g do material seco e triturado foi percolado com 100ml de etanol a 80%(v/v) 3 vezes, sonificados por 30 minutos

a 40°C no intervalo de 2 dias. Após esse período, o percolado foi filtrado e o solvente removido em evaporador rotativo, à temperatura de 50 °C. O extrato seco (3,0 g) foi suspenso em hexano, visando a remoção de clorofila. A fração percolada passou por secagem em temperatura ambiente, resultando no Extrato Bruto Percolado (EBP), guardado em freezer até o momento dos testes.

1.1 DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS PELO MÉTODO FOLIN-CIOCALTEAU

A determinação do OET de fenólicos totais (FT) presentes nas amostras foi realizada por meio da espectroscopia na região do ultravioleta, pelo método de Folin-Ciocalteu com adaptações do descrito por Whaterhouse (2002). As amostras foram solubilizadas em etanol, para se obter soluções de concentrações de 0,5 mg.mL⁻¹. Em seguida, foram transferidas alíquotas de 500 µL de cada solução para tubos âmbar, adicionados 2500 µL do reagente de Folin-Ciocalteu a 10% e 2,0 mL de solução de carbonato de sódio a 4%. Em seguida, os tubos foram agitados por 1 minuto em vórtex. A seguir, as soluções foram armazenadas ao abrigo da luz por um período de duas horas. Ao término do período, foram realizadas as leituras em um espectrofotômetro Shimadzu SPECTROPHOTOMETER UV-1800® no comprimento de onda de 720 nm. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

O OET de FT foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração, construída utilizando ácido gálico como padrão (40 a 160 mg.mL⁻¹) e expressos como mg de EAG (equivalente de ácido gálico) por g de amostra.

1.2 DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS PELO MÉTODO FAST BLUE

O OET de FT também foi determinado utilizando-se o reagente Fast Blue, de acordo com a metodologia descrita por Medina (2011), com modificações. As soluções do OEC e EBP foram preparadas em etanol absoluto PA na concentração de 0,5 mg.mL⁻¹. Posteriormente, alíquotas de 4 mL de cada uma das soluções foram transferidas para tubos âmbar e, de imediato, adicionou-se 0,4 mL do reagente 4-benzamido-2-ethoxy-5-methoxybenzene-1-diazonium

(Fast Blue B) a 0,01% (p/v) e 0,4 mL da solução de NaOH a 5% (p/v). Em seguida, as soluções foram agitadas por 1 minuto e deixadas em repouso ao abrigo da luz por 90 minutos.

Para a construção da curva de regressão linear foram preparadas soluções de ácido gálico PA nas concentrações de 40a 400 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$. Estas foram submetidas as mesmas condições das amostras e as leituras das absorbâncias foram realizadas em um espectrofotômetro Shimadzu SPECTROPHOTOMETER UV-1800® no comprimento de onda de 720 nm. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para estimar os OET de FT nas amostras, segundo os métodos propostos, foram feitas a análise de regressão linear, a partir das quais foram observados um $r^2 = 0,998$, para o método de Folin-Ciocalteu e $r^2 = 0,997$, para o método de Fast Blue, demonstrando a linearidade das análises realizadas. Os valores foram expressos em grama equivalente a ácido gálico por 100 gramas de amostra. Nos testes de quantificação de compostos FT para o OET, na concentração de 0,1 $\text{mg}.\text{mL}^{-1}$, observa-se $4,95 \pm 0,23 \text{ g EAG.100 g}^{-1}$ usando o método de Folin-Ciocalteu e de $5,65 \pm 0,18 \text{ g EAG.100 g}^{-1}$, na metodologia baseada no reagente Fast Blue.. Para EBP observa-se valores maiores de FT e, consequentemente, uma maior atividade antioxidante de acordo com a **Tabela 1.**

Tabela 1. Resultados dos testes de avaliação da atividade antioxidante do óleo essencial de tomilho com seus respectivos desvios padrão.

	Concentração (mg/mL)	Salt Fast Blue (g EAG.100 g – de amostra)	Folin –Ciocalteu (g- EAG.100 g-1 de amostra)
OET	0,500	5,65±0,18	4,95±0,23
EBP	0,500	12,561 ± 0,005	12,713±0,037

EAG (Equivalente de quercentina); EBP(Extrato Bruto Percolado); OET (óleo essencial *Thymus Vulgaris L*)

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

O maior OETr de FT, no método de Fast Blue, é observado para EBP, indicando que o extrato possui uma maior concentração e, possivelmente, uma

variedade mais ampla de compostos bioativos em comparação ao óleo essencial, mesmo tendo o constituinte fenólico timol como majoritário. Este perfil é comum em extratos brutos, que costumam reter uma diversidade maior de compostos (Mello e et al 2017)

No teste de Folin-Ciocalteu, a tendência se manteve, com o EBP apresentando uma atividade antioxidante superior ao OET. Além disso, os resultados do EBP no teste de Fast blue foram mais consistentes, com menor desvio padrão, indicando maior reprodutibilidade dos dados para essa amostra. Essa constância reforça a confiabilidade das metodologias empregadas demonstrando que ambos os métodos de análise corroboram que o EBP apresenta maior concentração de FT, indicando um possível maior potencial antioxidante.

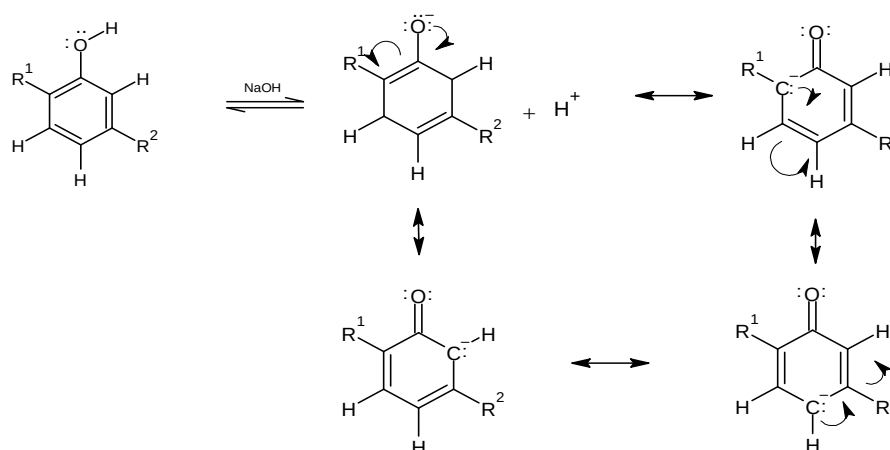
Compostos fenólicos são antioxidantes naturais e podem ser estimados por métodos espectrofotométricos, utilizando os reagentes Folin-Denis, Folin-Ciocalteu e Fast Blue. O método mais usado é o Folin-Ciocalteu, nesse reagente é uma mistura de molibdênio e o tungstênio, em seus estados de oxidação 6^+ , de coloração amarela. Em meio alcalino e em presença de agentes redutores, tem-se a formação de molibdênio azul e tungstênio azul, resultando de uma média de espécies nos estados de oxidação 5^+ e 6^+ . Porém a reação com agentes redutores não se limita a compostos fenólicos, podem ser, por exemplo, ácido ascórbico, glicose, frutose e sulfitos, o que interfere nos resultados da quantificação de compostos fenólicos. Segundo Gondim et al. (2005) e Stefanello & Rosa (2012), extratos de frutas possuem diversos compostos vitamínicos, carboidratos, lipídeos e minerais, podendo atuar como agentes redutores e favorecer a redução dos íons molibdênicos e tungstênicos presentes no reagente Folin-Ciocalteu. Em comparação com o método do Folin-Ciocalteu, o resultado adquirido com o reagente Fast Blue não produz esta interferência, de modo que a natureza da amostra não interfere nos resultados.

Os óleos essenciais geralmente são constituídos por metabólitos secundários da classe dos terpenos e terpenóides e são uma matriz biológica livre de compostos que podem desencadear reações químicas com o reagente de Folin-Ciocalteu e ocasionar desvios nos resultados. Em vista disso, a

quantificação dos compostos fenólicos usando as duas metodologias auxilia na confirmação dos resultados pelos métodos utilizados e a buscar compreender os mecanismos reacionais envolvidos, reafirma a confiança dos resultados.

O reagente de Fast Blue trata-se de um sal de diazônio, que promove uma substituição eletrofílica nos compostos fenólicos, o que resulta na formação de um complexo azo que absorve a radiação na região do visível. Em meio alcalino o grupo hidroxila de composto fenólicos sofrem desprotonação, resultando em maior ativação do anel frente ao eletrófilo, ataque que ocorre nas posições orto ou para, a depender de fatores estéricos do composto fenólico envolvido (**Figura 1**). O íon diazônio atua como eletrófilo, levando uma reação de acoplamento azo com o anel, cujo produto absorve na região do visível a 720 nm. Por consequência, o reagente Fast Blue reagirá especificamente com compostos que possuam anéis aromáticos com grupos ativadores, visto que o mecanismo de reação é de substituição eletrofílica aromática (**Figura 2**).

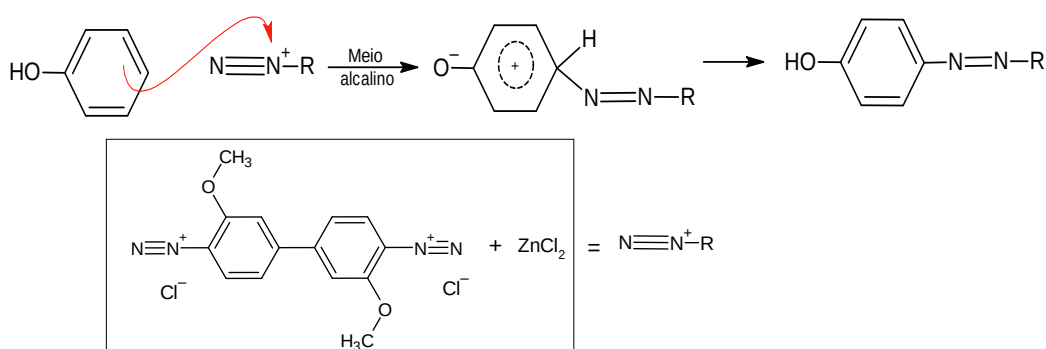
Figura 1: Contribuintes de ressonância no íon fenóxido



Timol $R^1 =$ Isopropil; $R^2 =$ Metil / Carvacrol $R^1 =$ Metil; $R^2 =$ Isopropil

Fonte: Autor, 2024.

Figura 2 – Mecanismo esquemático de reação sal de Fast Blue e composto fenólico.

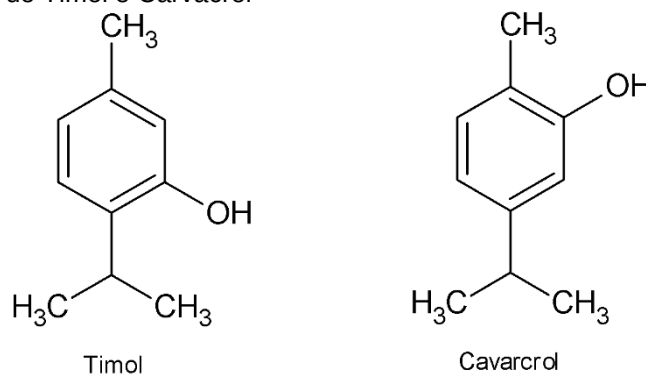


Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

Os constituintes majoritários encontrados no óleo essencial de *T. vulgaris* foram o timol e o carvacrol (**Figura 3**), ambos monoterpênóides fenólicos (Trombetta et al., 2005). Vários estudos envolvendo o OET relatam a presença desses compostos como constituintes majoritários (Agili, 2014; Marguerite et al., 2015; Khan et al., 2019b).

No timol, o radical metil está ligado ao átomo de carbono 5 (C-5) e o radical isopropil está no C-2; enquanto no carvacrol, o radical metil está no C-2 e o substituinte isopropil está no C-5, em relação à hidroxila que se encontra no C-1 nos dois compostos. A presença do grupo hidroxila contribui para o sistema de deslocalização de elétrons (Kachura & Suntres, 2020b), conduzindo as reações de redução/oxidação no reagente Folin-Ciocalteu e favorecendo a liberação do próton devido à ressonância no anel, enquanto no reagente Fast Blue, a hidroxila desempenha o papel de grupo ativador do anel aromático, favorecendo as reações de substituição eletrofílica nos carbonos orto e para do anel aromático, devido à sua maior densidade eletrônica.

Figura 3 - Estrutura do Timol e Carvacrol



Fonte: Elaborado pelo autor, 2024

O ataque eletrofílico do grupamento diazina do reagente Fast Blue, tanto no timol quanto no carvacrol, é favorecido na posição para (C-4) em relação à hidroxila fenólica, devido à maior densidade eletrônica neste átomo de carbono, provocada pelas estruturas de ressonância do anel, e pelo fato das posições orto estarem ocupadas ou com impedimento estérico. Além disso, como a posição para (C-4) no timol tem um impedimento estérico menor, devido à presença do grupo metil no C-5, em relação à posição para (C-4) no carvacrol, que tem um grupo isopropil no C-5, a reação de substituição eletrofílica aromática no timol é favorecida em relação ao carvacrol (Figura 5).

Dessa forma, o reativo Fast blue mostra-se como reagente de alta seletividade para detecção e quantificação de compostos fenólicos presentes em matrizes diversas, com alta sensibilidade através da formação do complexo minimizando a interferência de outros compostos não fenólicos presentes na amostra em concentrações mínimas.

Embora o extrato bruto de *T. vulgaris* e outras espécies tenha uma diversidade de compostos, ele pode apresentar uma concentração mais baixa de alguns componentes específicos que estão presentes em maior quantidade no óleo essencial (Costa et al., 2019; Saboia et al., 2022). O óleo essencial, por ser obtido por meio de processos que isolam componentes voláteis, costuma concentrar monoterpenos e fenóis com alta atividade antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória, como o timol e o carvacrol (Mancini. Et al, 2015; LIU et al., 2021b; LEUTHIER., et al 2021), permanecendo com um potencial botânico interessante.

No entanto, o extrato bruto, por englobar uma gama maior de compostos, incluindo flavonoides, taninos e outros fenólicos hidrossolúveis, pode ter um perfil de bioatividade mais abrangente. Isso possibilita efeitos sinérgicos entre os compostos, potencializando suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas e promovendo maior eficácia em certas aplicações, como em formulações cosméticas e fitoterápicas (Reis et al., 2022).

Assim, embora o óleo essencial de *T. vulgaris* seja mais potente em algumas atividades específicas, o extrato bruto se destaca pela diversidade de

compostos bioativos, conferindo-lhe uma bioatividade mais ampla e adequada para diferentes usos terapêuticos.

3. CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados, conclui-se que EBP de *T. vulgaris* apresenta uma concentração significativamente maior de compostos fenólicos em comparação OET. O método Fast Blue demonstrou ser mais específico e reprodutível para a quantificação de compostos fenólicos, evitando interferências de substâncias não fenólicas presentes na amostra, enquanto o método de Folin-Ciocalteu, embora amplamente utilizado, mostrou-se mais suscetível a interferências.

Além disso, a presença de compostos bioativos majoritários como o timol e o carvacrol no óleo essencial destaca seu potencial antioxidante e antimicrobiano, porém o EBP, devido à sua maior diversidade de compostos, apresentou um perfil de bioatividade mais amplo e promissor para aplicações cosméticas e terapêuticas. Essa diferença sugere que, enquanto o óleo essencial pode ser mais eficaz em atividades específicas, o extrato bruto oferece maior versatilidade e sinergia entre seus componentes, sendo indicado para formulações com objetivos mais abrangentes.

4.REFERÊNCIAS

SANTOS, A.V. Óleos essenciais da família Lamiaceae utilizados para controle de culicídeos vetores: uma revisão sistemática. 2022.

MENEZES, P. M. N. et al. Atividade farmacológica de óleos essenciais no sistema respiratório: uma revisão sistemática de estudos pré-clínicos. Revista Eletrônica de Farmácia, Goiânia, v. 14, n. 3, 2018. DOI: 10.5216/ref.v14i3.44485.

POMBO, J. C. et al. Efeito antimicrobiano e sinérgico de óleos essenciais sobre bactérias contaminantes de alimentos. Segurança Alimentar e Nutricional, Campinas, SP, v. 25, n. 2, p. 108–117. 2018. DOI: 10.20396/san.v25i2.8651785.

LIMA, F. C. C. et al. A utilização de óleos essenciais de Lavandula angustifolia, Pelargonium graveolens e Citrus bergamia no combate à ansiedade / the use of essential oils from Lavandula angustifolia, Pelargonium graveolens, Citrus bergamia in the fight against anxiety. Brazilian Journal of Development, [S. l.], v. 7, n. 4, p. 41031–41046, 2021. DOI: 10.34117/bjdv7n4-525.

CASTILHO, G. K. et al. Estudo sobre os tipos de extração para óleos essenciais e óleos vegetais. RCMOS - Revista Científica Multidisciplinar O Saber, Brasil, v. 1, n. 10, p. 52–59, 2024. DOI: [10.51473/rcmos.v1i1.2022.152](https://doi.org/10.51473/rcmos.v1i1.2022.152).

SOUZA, R. R; GASPAROTI, P. S; DE PAULA, J.A. M. Obtenção de extratos de plantas medicinais: uma revisão de escopo dos métodos extrativos modernos em comparação ao método clássico por SOXHLET. Movimenta (ISSN 1984-4298), v. 15, n. 1, p. e20220013-e20220013, 2022.

PEÑARRIETA, M.J et al. Phenolic compounds in food. Revista Boliviana de Química, v.31, n.2, p. 68-81, 2014. DOI: 10.13140/RG.2.1.5018.1840.

HISTER, C. A. L. et al. Atividade antiproliferativa e determinação dos compostos fenólicos de extratos aquosos de amoreira-preta (Rubus sp.) pelo sistema teste in vivo de Allium cepa L. Revista Brasileira de Biociências, [S. l.], v. 15, n. 1, 2017.

DEUS, V. L. et al. Compostos fenólicos em hortaliças cultivadas nos sistemas convencional e orgânico: uma revisão. Brazilian Journal of Health and Pharmacy, [S. l.], v. 1, n. 1, p. 70–84, 2019.

GUERRA, A. P.; GARCIA, V. A. S.; SILVA, C. Otimização Da Extração De Compostos Fenólicos Da Casca De Manga (Tommy Atkins) Utilizando Processo Assistido Por Ultrassom. e-xacta, v. 9, n. 1, p. 103, 2016. DOI: 10.18674/exacta.v9i1.1783.

FERNANDES, R. Maça: compostos fenólicos e saúde. Revista Interdisciplinar de Estudos em Saúde, [S. l.], v. 8, n. 2, p. 29–33, 2019. DOI: 10.33362/ries.v8i2.2062

LEAL, J. B. et al. Resveratrol: composição química e seus benefícios à saúde. RBONE-Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento, 11(67), 620-629, 2017.

HOSSEINZADEH, S. et al. The application of medicinal plants in traditional and modern medicine: a review of *Thymus Vulgaris L.* International Journal of Clinical Medicine, v. 6, n. 9, p. 635-642, 2015.

KUETE, V. *Thymus Vulgaris L.* Medicinal spices and vegetables from Africa, p. 599-609, 2017.

ROCHA, R. P. DA et al. Influência do processo de secagem sobre os principais componentes químicos do óleo essencial de tomilho. Revista Ceres, v. 59, n. 5, p. 731–737, out. 2012. DOI: [i.org/10.1590/S0034-737X2012000500021](https://doi.org/10.1590/S0034-737X2012000500021).

LIU, T.; KANG, J.; LIU, L. Thymol as a critical component of *Thymus Vulgaris L.* essential oil combats *Pseudomonas aeruginosa* by intercalating DNA and inactivating biofilm. LWT, v. 136, n. P2, p. 110354, jan. 2021. DOI: [10.1016/j.lwt.2020.110354](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110354)

WANG L. H.; ZHANG Z. H.; ZENG X. A.; GONG D. M.; WANG M. S. Combination of microbiological, spectroscopic and molecular docking techniques to study the antibacterial mechanism of thymol against *Staphylococcus aureus*: membrane damage and genomic DNA binding. Bioanal Chem. 2017 Feb;409(6):1615-1625. DOI: 10.1007/s00216-016-0102-z.

KHALIL, N. et al. Foliar spraying of salicylic acid induced accumulation of phenolics, increased radical scavenging activity and modified the composition of the essential oil of water stressed *Thymus Vulgaris L.* Plant Physiology and Biochemistry, v. 123, p. 65–74, 2018. DOI: 10.1016/j.plaphy.2017.12.007.

KACHURA, K.; SUNTRES, Z. The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v. 60, n. 18, p. 3042–3053, 2020. DOI: 10.1080/10408398.2019.1675585

KHAN, A. A.; AMJAD, M. S.; SABOON. GC-MS Analysis and biological activities of *Thymus Vulgaris* and *Mentha arvensis* essential oil. Turkish Journal of Biochemistry, v. 44, n. 3, p. 388–396, 2019. DOI:10.1515/tjb-2018-0258.

Catella, C. et al. Virucidal and antiviral effects of *Thymus Vulgaris* essential oil on feline coronavirus.

Research in Veterinary Science,V. 137, p. 44-47, 2021.
DOI:doi.org/10.1016/j.rvsc.2021.04.024.

SARDARI S. et al. Therapeutic Effect of *Thyme (Thymus Vulgaris)* Essential Oil on Patients with COVID19: A Randomized Clinical Trial. J Adv Med Biomed Res, v.29, p.83-91 2021.

MOISES, O L; DA COSTA, D.L.M.G; CORINGA,E.A.O. Otimização da extração solido-liquido de substâncias polares da farinha da casca da pitaya. Revista Brasileira de Ciências Agrárias, [S. l.], v. 15, n. 3, p. 1-10, 2021. DOI: 10.5039/agraria.v15i3a6905.

OLIVEIRA, J. P. et al. Evaluation of the antioxidant activity and total phenolic compounds of lychee pulp by different dehydration methods. Revista Engenharia na Agricultura - REVENG, [S. l.], v. 31, n. Contínua, p. 43–50, 2023. DOI: 10.13083/reveng.v30i1.14699.

MAIA, P. M. et al. Estudo farmacognóstico de leonotis nepetifolia (L.) R. Br.(lamiaceae). In: PLANTAS MEDICINAIS: SABEDORIA TRADICIONAL E CIÊNCIA MODERNA-VOLUME 1. Editora Científica Digital, 2024. p. 57-78.

SOARES, N et al.. Técnicas de prospecção fitoquímica e sua importância para o estudo de biomoléculas derivadas de plantas . ENCICLOPEDIA BIOSFERA, [S. l.], v. 13, n. 24, 2016.

Inmet. Instituto nacional de meOETrologia, <http://www.inmet.gov.br>.

WHATERHOUSE, A. L. Polyphenolics: Determination of total phenolic. In: WROLSTAD, R, E. Current Protocols in Food Analytical Chemistry. New York: John Walley& Sons, 2002. Cap. |1.1, p. |1.1.1-|1.1.8. DOI: <https://doi.org/10.1002/0471142913.fai0101s06>.

MEDINA, M. B. Determination of the total phenolics in juices and superfruits by a novel chemical method. Journal of Functional Foods, v. 3, n. 2, p. 79–87, abr. 2011. DOI: [10.1016/j.jff.2011.02.007](https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.02.007)

Mello, L et al. Farmacognosia do produto natural ao medicamento. (2017)

GUIMARÃES, K. C.; SALGADO, D. L.; CARVALHO, E. E. N. Evaluation Of Different Methodologies For The Determination Of Phenolic Compounds In Tropical Fruits. Brazilian Journal of Food Technology, v. 23, p. 1–7, 2020. DOI: 10.1590/1981-6723.01519

PETERSON, G. L. [12] Determination of total protein. Methods in Enzymology. [s.l: s.n.]. v. 91p. 95–119. Academic Press, Volume 91, 1983, Pages 95-119. DOI: 10.1016/S0076-6879(83)91014-5.

CAREY, F. A. Química orgânica. 7 ed. Porto Alegre: AMGH, 2011.

AGILI, F.A. Chemical Composition, Antioxidant and Antitumor Activity of *Thymus Vulgaris* L. Essential Oil. Middle-East Journal of Scientific Research, v. 21, n. 10, p. 1670–1676, 2014. DOI: 10.15835/nbha47311451

MARGUERITE SIMO KAMDEM et al. Antiradical, Anti-inflammatory and Antifungal Activities of Essential Oils of Two Aromatic Plants: *Apium graveolens* (Apiaceae) and *Thymus Vulgaris* (Lamiaceae). Journal of Life Sciences, v. 10, n. 2, p. 51–64, 2015. DOI: 10.17265/1934-7391/2015.02.002

COSTA, A. P et al. Extrato aquoso e óleo essencial de gengibre induzem mecanismos bioquímicos de defesa em feijoeiro. REVISTA DE AGRICULTURA NEOTROPICAL, [S. I.], v. 6, n. 2, p. 79–86, 2019. DOI: 10.32404/rean.v6i2.2721

SABOIA, C. da S. et al. Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oil and crude extract of lemon grass (*Cymbopogon citratus*). Research, Society and Development, [S. I.], v. 11, n. 7, p. e37611730064, 2022. DOI: 10.33448/rsd-v11i7.30064.

MANCINI, E.; SENATORE, F.; MONTE, D.D.; MARTINO, L.D. Studies on Chemical composition, Antimicrobial and Antioxidant Activities of Five *Thymus Vulgaris* L. Essential Oils. Molecules, v. 20, n. 7, p. 12016–12028, 2015.

LEUTHIER, L. L.; SILVA, E. C. A. da.; ALMEIDA JÚNIOR, A; NUNES, J. M. F. F; SAMPAIO, F. C; FARIAS, I. A. P. Effect of *Origanum vulgare* L. essential oil and carvacrol on the growth of pathogenic bacteria in the oropharynx. Research, Society and Development, [S. I.], v. 10, n. 1, p. e45210111754, 2021. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/11754> . . DOI: 10.33448/rsd-v10i1.11754.

GUIMARÃES, K. C.; SALGADO, D. L.; CARVALHO, E. E. N. Evaluation Of Different Methodologies For The Determination Of Phenolic Compounds In Tropical Fruits. Brazilian Journal of Food Technology, v. 23, p. 1–7, 2020. DOI: 10.1590/1981-6723.01519

GONDIM, J. A. M.; MOURA, M. V.; DANTAS, A. S.; MEDEIROS, R. L. S.; SANTOS, K. M. Composição centesimal e de minerais em cascas de frutas. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 25, n. 4, 2005.

STEFANELLO, C. L.; ROSA, C. S. Composición aproximada de las cáscaras de diferentes frutas. Revista de Ciencia y Tecnología, n. 17, 2012.

ROJAS DE ASTUDILLO, L. Caracterización química cuantitativa de metabolitos secundarios en plantas medicinales. Universidad Técnica De Machala, 2019.

Reis,J.T et all. “Parâmetros Químicos e Biológicos da Espécie Nativa Duguetiafurfuracea (A.St.-Hill) encontrada na zona transição da amazônia Maranhense, Brasil”, International Journal of Development Research, 12, 2022 (08), 58154-58157.