



RAFAELA VIEIRA SOUZA

**POTENCIAL ANTIOXIDANTE, ANTITUMORAL E
ANTIFÚNGICO DE CONSTITUINTES DE ÓLEOS
ESSENCIAIS**

LAVRAS – MG

2018

RAFAELA VIEIRA SOUZA

**POTENCIAL ANTIOXIDANTE, ANTITUMORAL E ANTIFÚNGICO DE CONSTITUINTES
DE ÓLEOS ESSENCIAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Agroquímica, área de concentração em Química/Bioquímica, para a obtenção do título de Mestre.

Dra. Maria das Graças Cardoso

Orientadora

LAVRAS – MG

2018

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Souza, Rafaela Vieira.

Potencial antioxidante, antitumoral e antifúngico de
constituintes de óleos essenciais / Rafaela Vieira Souza. - 2018.
125 p. : il.

Orientador(a): Maria das Graças Cardoso. .

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Produtos naturais. 2. Potencial biológico. 3. Componentes de
óleos essenciais. I. Cardoso, Maria das Graças. . II. Título.

RAFAELA VIEIRA SOUZA

**POTENCIAL ANTIOXIDANTE, ANTITUMORAL E ANTIFÚNGICO DE
CONSTITUINTES DE ÓLEOS ESSENCIAIS**

**ANTIOXIDANT, ANTITUMORAL AND ANTIFUNGAL POTENTIAL OF
ESSENTIAL OIL CONSTITUENTS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Agroquímica, área de concentração em Química/Bioquímica, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 19 de fevereiro de 2018

Dra. Marisa Ionta UNIFAL

Dr. Luís Roberto Batista UFLA

Dra. Maria das Graças Cardoso
Orientadora

LAVRAS – MG

2018

*A Deus, não por me dar fardos mais leves,
mas, sim, ombros mais fortes durante a caminhada.*

*A Ele, meu guia, protetor e autor
das boas obras que ocorrem em minha vida.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus e à Nossa Senhora, por serem meu sustento, iluminando meu caminho, dando-me força, determinação, saúde e sabedoria para alcançar meus objetivos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pelo suporte financeiro.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Química, pela oportunidade de realizar este trabalho.

Aos meus pais, Roberta e Vitor, pelo amor, compreensão e amparo e aos meus familiares pelo apoio durante esse período. Em especial à Giovanna, por sua capacidade em alegrar os meus dias com sua pureza e inocência.

Ao Dionízio, por ser um anjo em minha vida, disposto a me ajudar e aconselhar, compartilhar comigo diversos momentos e me fazer feliz por meio de suas palavras e gestos.

À professora Dra. Maria das Graças Cardoso, pela orientação e por ser tão prestativa e solícita diante das necessidades, além de contribuir para o meu crescimento profissional.

À professora Dra. Marisa Ionta, pela disponibilidade e auxílio nas fases de execução do experimento na parte antitumoral e ao seu orientado Renato, pela dedicação e ajuda nessas etapas.

Ao professor Dr. Luis Roberto Batista, por abrir as portas de seu laboratório para as análises antifúngicas e estar disponível em me atender sempre que necessário.

Ao professor Dr. Cleber Nogueira Borges, pela prestabilidade e dedicação nas análises dos testes antioxidantes.

Aos amigos e companheiros de laboratório, Danúbia, Maisa, Wilder, Gabriel, Manuel, Renan, Rafaela Zaniti, Alex, Richard, Allan, Gustavo, Eduarda, Letícia e Cleusa, pela parceria, amizade e convivência. Em especial à Maria Luisa pela ajuda e boa vontade em ajudar nas análises, à Rafaela Brandão, Jéssica e Luana, pelo auxílio na condução dos experimentos e à Vanúzia e Karen, pelo companheirismo no decorrer do mestrado.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, pelo empenho e responsabilidade para com os discentes do curso.

Aos funcionários do Departamento de Química, pelo trabalho, atenção e colaboração.

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para a consolidação deste trabalho.

RESUMO

Os produtos naturais são importantes fontes de descoberta de novos agentes medicinais e, devido ao potencial biológico e farmacológico desses compostos, torna-se necessário realizar estudos que viabilizem a sua aplicação. Objetivou-se neste trabalho avaliar o potencial antioxidante de constituintes de óleos essenciais por diferentes metodologias, estudar o potencial antitumoral desses compostos sobre linhagens de células de câncer humano, bem como avaliar o potencial antifúngico de determinados constituintes. Os testes antioxidantes foram avaliados por metodologias que envolvem a estabilização de radicais livres, inibição da peroxidação lipídica e complexação de metais. Os testes antitumorais foram realizados em três linhagens celulares derivadas de tumores humanos: MCF-7, A549, e HT144. A viabilidade celular foi medida pelo ensaio colorimétrico com o corante resazurina. Para a determinação das populações celulares nas diferentes fases do ciclo celular, analisou-se o conteúdo de DNA, por citometria de fluxo. A avaliação do efeito inibitório dos compostos *p*-cimeno, eugenol, carvacrol, citral, *trans*-cariofileno e *trans*-farnesol foi testada sobre os fungos *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus niger*, empregando-se a metodologia de difusão em disco. Avaliou-se o efeito dos compostos eugenol, carvacrol e citral sobre o crescimento micelial dos fungos *A. carbonarius* e *A. niger* em diferentes temperaturas. De modo geral, os compostos apresentaram baixa atividade antioxidante, exceto pelo carvacrol, timol e eugenol, que se mostraram mais ativos diante das metodologias testadas. Os constituintes carvacrol, timol, citral e eugenol apresentaram inibição expressiva da viabilidade celular das linhagens de células tumorais testadas. Os valores de IC₅₀ encontrados para o citral revelaram melhor resposta para a linhagem HT144. O composto induziu bloqueio no ciclo celular na transição G1/S, mas não estimulou a morte celular. A análise da atividade inibitória dos fungos revelou que os compostos eugenol, carvacrol e citral mostraram maior capacidade em inibir o crescimento dos micro-organismos avaliados. Esses constituintes também influenciaram o crescimento micelial dos fungos *A. niger* e *A. carbonarius* em diferentes temperaturas, sendo as temperaturas de 20 °C e 25°C mais propícias para o desenvolvimento dos fungos. Os resultados encontrados mostraram-se promissores na busca por compostos bioativos. Estudos envolvendo esses constituintes em outras atividades, bem como em associação com os compostos sintéticos já empregados a fim de diminuir a toxicidade e resistência dos mesmos e avaliar o efeito sinérgico entre eles, podem ser relevantes.

Palavras-chave: Produtos naturais. Potencial biológico. Componentes de óleos essenciais.

ABSTRACT

Natural products are important sources of discovery of new medicinal agents, and it is necessary to perform studies that enable their application because of the biological and pharmacological potential of these compounds. The objective of this study was to evaluate the antioxidant potential of constituents of essential oils by different methods to study the antitumor potential of these compounds against human cancer cell lines, as well as to evaluate the antifungal potential of certain constituents. The antioxidant tests were evaluated by methods that involve the stabilization of free radicals, inhibition of lipid peroxidation and complexation of metals. Antitumor tests were performed on three cell lines derived from human tumors: MCF-7, A549, and HT144. Cell viability was measured by the colorimetric assay using the resazurin dye. For the determination of the cell populations in the different phases of the cell cycle, the DNA content was analyzed by flow cytometry. The evaluation of the inhibitory effect of *p*-cymene, eugenol, carvacrol, citral, *trans*-caryophyllene and *trans*-farnesol on the *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus niger* fungi was achieved using the disc diffusion method. The effect of eugenol, carvacrol and citral on the mycelial growth of *A. carbonarius* and *A. niger* fungi at different temperatures was evaluated. In general, the compounds presented low antioxidant activities, except for carvacrol, thymol and eugenol, which were more active in the methods tested. Expressive inhibition of the cellular viability of the tumor cell lines was observed for the constituents carvacrol, thymol, citral and eugenol. The IC 50 values found for citral demonstrated a better response to the HT144 lineage. The compound induced cell cycle blockage in the G1/S transition, but it did not stimulate cell death. Analysis of inhibitory activity against the fungus revealed that the eugenol, carvacrol and citral compounds possessed a greater ability to inhibit the growth of the microorganisms evaluated. These constituents also influenced the mycelial growth of the *A. niger* and *A. carbonarius* fungi at different temperatures, and temperatures of 20 °C and 25 °C were more favorable for fungal development. The results found were promising in the search for bioactive compounds. Studies involving these constituents in other activities, as well as in association with synthetic compounds that are already employed to decrease their toxicities and resistance and to evaluate synergistic effects, might be relevant.

Keywords: Natural products. Biological potential. Components of essential oils.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1- Rota metabólica de formação dos metabólitos secundários. | 17 |
| Figura 2 – Estrutura química do isopreno. | 18 |
| Figura 3– Biossíntese dos terpenos pela via do mevalonato. (Continua)..... | 18 |
| Figura 4- Biossíntese dos terpenos via DXPS. (Continua)..... | 21 |
| Figura 5- Representação química básica de um fenilpropanoide. | 24 |
| Figura 6- Mecanismo de formação da estrutura básica dos fenilpropanoides. (Continua) | 25 |
| Figura 7- Mecanismo de reação entre o radical DPPH• e um antioxidante mediante a transferência de um átomo de hidrogênio. | 37 |
| Figura 8- Mecanismo de reação entre o radical DPPH• e um antioxidante mediante a transferência de um elétron..... | 37 |
| Figura 9 - Estabilização do radical ABTS ^{•+} por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio. | 38 |
| Figura 10 - Reações de Haber-Weiss e de Fenton para formação do radical hidroxil. | 39 |
| Figura 11- Reação de oxidação do sistema β-caroteno/ ácido linoleico. | 40 |
| Figura 12- Reações de redução do ferricianeto a ferrocianeto. | 41 |
| Figura 13- Reação de redução do molibdênio empregando o ácido gálico como agente oxidante. | 42 |
| Figura 14- Possível rota para a morte de células cancerígenas mediada por óleos essenciais. | 45 |
| Figura 15– Estruturas químicas dos constituintes de óleos essenciais. (Continua)..... | 50 |
| Figura 16 – Estrutura química dos compostos testados na atividade antifúngica. | 57 |
| Figura 17 – Distribuição das respostas em relação a resposta de atividade antioxidante (AA%) analisada por diferentes metodologias..... | 59 |
| Figura 18 – Atividade antioxidante dos compostos (%) por diferentes metodologias juntamente com suas respectivas concentrações (μg mL ⁻¹)..... | 61 |
| Figura 19 – Dispersão dos valores da atividade dos compostos separados pela variável concentração nas metodologias de estabilização de radicais..... | 62 |
| Figura 20 – Dispersão dos valores da atividade dos compostos separados pela variável concentração nas metodologias de inibição da peroxidação lipídica. | 63 |
| Figura 21 - Atividade antioxidante dos compostos versus concentrações (μg mL ⁻¹) pela metodologia do DPPH – valores específicos no eixo das ordenadas. | 64 |
| Figura 22 - Atividade antioxidante dos compostos versus concentrações (μg mL ⁻¹) pela metodologia do ABTS – valores específicos no eixo das ordenadas. | 65 |
| Figura 23 - Atividade antioxidante dos compostos versus concentrações (μg mL ⁻¹) pela metodologia do hidroxil – valores específicos no eixo das ordenadas..... | 66 |
| Figura 24 - Atividade antioxidante dos compostos versus concentrações (μg mL ⁻¹) pela metodologia do β-caroteno – valores específicos no eixo das ordenadas. | 67 |
| Figura 25 - Atividade antioxidante dos compostos versus concentrações (μg mL ⁻¹) separados pelos 29 compostos pela metodologia do sequestro de radicais DPPH - valores únicos no eixo das ordenadas..... | 68 |
| Figura 26 – Provável mecanismo que explica a redução do radical DPPH e a estabilização por ressonância do radical formado nos compostos BHT e eugenol. | 70 |
| Figura 27 - Atividade antioxidante dos compostos versus concentrações (μg mL ⁻¹) pela metodologia do ABTS - valores únicos no eixo das ordenadas. | 71 |
| Figura 28 – Mecanismo de formação do cromóforo no teste hidroxil a partir da degradação da 2-desoxirribose seguida da reação do ácido tiobarbitúrico e malonaldeído. (Continua)..... | 72 |

| | |
|---|-----|
| Figura 29 - Atividade antioxidante dos compostos versus concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) pela metodologia do hidroxil - valores únicos no eixo das ordenadas..... | 73 |
| Figura 30 – Início do processo de peroxidação lipídica. | 74 |
| Figura 31- Atividade antioxidante dos compostos versus concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) pela metodologia do β -caroteno – valores únicos no eixo das ordenadas..... | 75 |
| Figura 32 – Distribuição das respostas em relação a resposta de atividade antioxidante (AA%) analisada por metodologias que envolvem a redução de íons metálicos..... | 77 |
| Figura 33 – Valores de absorvância (nm^{-1}) dos compostos pelas metodologias que envolvem a redução de íons metálicos juntamente com suas respectivas concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$). | 78 |
| Figura 34 – Dispersão dos valores da atividade dos compostos separados pela variável concentração nas metodologias de redução de íons metálicos. | 79 |
| Figura 35 - Atividade antioxidante dos compostos versus concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) pela metodologia do poder redutor do ferro – valores específicos no eixo das ordenadas. | 81 |
| Figura 36 - Atividade antioxidante dos compostos versus concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) pela metodologia de redução do molibdênio – valores específicos no eixo das ordenadas..... | 82 |
| Figura 37- Atividade antioxidante dos compostos versus concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) pela metodologia do poder redutor do ferro - valores únicos no eixo das ordenadas. | 83 |
| Figura 38 - Atividade antioxidante dos compostos versus concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) pela metodologia da redução do molibdênio - valores únicos no eixo das ordenadas..... | 84 |
| Figura 39 – Atividade antioxidante dos compostos versus concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) pelas diferentes metodologias estudadas. | 85 |
| Figura 40 - Viabilidade celular (%) determinada por ensaio colorimétrico com resazurina em culturas de células tratadas por 48h com os diferentes compostos a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. (Continua) | 86 |
| Figura 41 – Estruturas químicas dos compostos mais ativos contra linhagens celulares derivadas de tumores humanos (MCF-7, HT-144 e A549). | 88 |
| Figura 42 – Viabilidade celular (%) determinada por ensaio colorimétrico com resazurina em culturas de células derivadas de tumores humanos tratadas com constituintes de óleos essenciais em diferentes concentrações por 48h. (Continua) | 90 |
| Figura 43 – Histogramas referentes ao efeito do citral (20 e $40 \mu\text{g mL}^{-1}$) na progressão do ciclo celular da linhagem HT144 por 48h (Continua). | 93 |
| Figura 44 – Estrutura química dos compostos fenólicos eugenol e carvacrol..... | 98 |
| Figura 45 - Estrutura química do composto citral. | 99 |
| Figura 46 - Estrutura química do composto trans-farnesol. | 100 |
| Figura 47- Estrutura química do composto p-cimeno. | 100 |
| Figura 48 - Estrutura química do composto trans-cariofileno. | 101 |
| Figura 49 – Inibição do crescimento micelial de <i>Aspergillus carbonarius</i> pelo composto carvacrol nas temperaturas de 25, 20 e 15 °C. | 104 |
| Figura 50 – Inibição do crescimento micelial de <i>Aspergillus carbonarius</i> pelo composto citral nas temperaturas de 25, 20 e 15 °C. | 104 |
| Figura 51 – Inibição do crescimento micelial de <i>Aspergillus carbonarius</i> pelo composto eugenol nas temperaturas de 25, 20 e 15 °C. | 105 |
| Figura 52 – Inibição do crescimento micelial de <i>Aspergillus niger</i> pelo composto carvacrol nas temperaturas de 25, 20 e 15 °C. | 107 |
| Figura 53 – Inibição do crescimento micelial de <i>Aspergillus niger</i> pelo composto citral nas temperaturas de 25, 20 e 15 °C. | 107 |
| Figura 54 – Inibição do crescimento micelial de <i>Aspergillus niger</i> pelo composto eugenol nas temperaturas de 25, 20 e 15 °C. | 108 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----|
| Tabela 1 – Análise do efeito do citral (20 e 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$) na progressão do ciclo celular da linhagem HT144 por 48h..... | 94 |
| Tabela 2 - Concentração mínima inibitória dos compostos <i>p</i> -cimeno, eugenol, carvacrol, citral, <i>trans</i> -cariofileno e <i>trans</i> -farnesol sobre fungos do gênero <i>Aspergillus</i> | 96 |
| Tabela 3 – Diâmetro médio do crescimento micelial do fungo <i>Aspergillus carbonarius</i> sobre o composto carvacrol..... | 102 |
| Tabela 4 – Diâmetro médio do crescimento micelial do fungo <i>Aspergillus carbonarius</i> sobre o composto citral. | 102 |
| Tabela 5 – Diâmetro médio do crescimento micelial do fungo <i>Aspergillus carbonarius</i> sobre o composto eugenol. | 103 |
| Tabela 6 – Diâmetro médio do crescimento micelial do fungo <i>Aspergillus niger</i> sobre o composto carvacrol..... | 105 |
| Tabela 7 – Diâmetro médio do crescimento micelial do fungo <i>Aspergillus niger</i> sobre o composto citral. | 106 |
| Tabela 8 – Diâmetro médio do crescimento micelial do fungo <i>Aspergillus niger</i> sobre o composto eugenol..... | 106 |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 14 |
| 2 REFERENCIAL TEÓRICO | 16 |
| 2.1 Metabolismo secundário dos vegetais..... | 16 |
| 2.2 Óleos essenciais | 17 |
| 2.2.1 Potencial biológico dos óleos essenciais e de seus constituintes | 30 |
| 2.3 Radicais livres | 31 |
| 2.4 Antioxidantes | 33 |
| 2.4.1 Sistema de defesa antioxidante | 33 |
| 2.4.2 Antioxidantes naturais..... | 34 |
| 2.4.3 Métodos espectrofotométricos para a determinação da atividade antioxidante <i>in vitro</i> | 35 |
| 2.4.3.1 Método do sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH•)..... | 36 |
| 2.4.3.2 ABTS..... | 38 |
| 2.4.3.3 Radical hidroxil..... | 38 |
| 2.4.3.4 Sistema β-caroteno/ácido linoleico | 39 |
| 2.4.3.5 Poder antioxidante de redução do ferro..... | 41 |
| 2.4.3.6 Redução do molibdênio..... | 41 |
| 2.5 Câncer 42 | |
| 2.5.1 Produtos naturais como agentes antitumorais | 43 |
| 2.6. Fungos toxigênicos em alimentos e produção de micotoxinas | 46 |
| 2.6.1 Óleos essenciais e seus constituintes como antifúngicos | 47 |
| 2.6.2 Fungos do gênero <i>Aspergillus</i> | 48 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 50 |
| 3.2.1 Método do sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH•)..... | 52 |
| 3.2.2 ABTS 52 | |
| 3.2.3 Radical hidroxil..... | 53 |
| 3.2.4 Sistema β-caroteno/ácido linoleico | 53 |

| | |
|--|-----|
| 3.2.5 Poder antioxidante de redução do ferro (FRAP) | 54 |
| 3.2.6 Redução do molibdênio..... | 54 |
| 3.2.7 Avaliação dos dados..... | 54 |
| 3.3 Atividade antitumoral <i>in vitro</i> | 55 |
| 3.3.1 Linhagens celulares e esquema de tratamento | 55 |
| 3.3.2 Análise da viabilidade celular | 55 |
| 3.3.3 Quantificação do DNA para análise da progressão do ciclo celular | 56 |
| 3.4 Atividade antifúngica | 56 |
| 3.4.1 Avaliação do efeito inibitório de constituintes de óleos essenciais sobre fungos do gênero <i>Aspergillus</i> | 57 |
| 3.4.2 Efeito dos compostos sobre o crescimento micelial dos fungos | 58 |
| 3.4.2.1 Avaliação dos dados e análise estatística | 58 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 59 |
| 4.1 Atividade antioxidante por diferentes metodologias | 59 |
| 4.2 Atividade antitumoral..... | 86 |
| 4.3 Efeito inibitório dos constituintes de óleos essenciais sobre fungos do gênero <i>Aspergillus</i> | 95 |
| 4.4 Efeito dos compostos eugenol, carvacrol e citral sobre o crescimento micelial dos fungos <i>Aspergillus carbonarius</i> e <i>Aspergillus niger</i> em diferentes temperaturas..... | 102 |
| 5 CONCLUSÃO | 109 |
| REFERÊNCIAS | 111 |
| APÊNDICE | 122 |

1 INTRODUÇÃO

Desde os tempos remotos, a humanidade faz uso de produtos naturais, a fim de aumentar as chances de sobrevivência, bem como melhorar as condições de vida, uma vez identificadas as necessidades de alívio e cura de doenças por meio da ingestão de ervas e folhas de plantas. Como consequência, os povos primitivos adquiriram um profundo conhecimento acerca dos recursos oferecidos pela natureza, considerado um fator fundamental para o descobrimento de substâncias tóxicas e medicamentosas no decorrer do tempo. Com isso, a convivência e o aprendizado com as diversas etnias trouxeram contribuições valiosas para o desenvolvimento da pesquisa em produtos naturais, como a compreensão da relação entre a estrutura química de um determinado composto e suas propriedades biológicas.

A busca por substâncias naturais com a capacidade de não serem tóxicas originou um grande número de estudos em relação ao potencial antioxidante dos óleos essenciais e seus componentes isolados, já que possuem a capacidade de proteger determinados substratos da oxidação. Isso é evidenciado nas indústrias alimentícias, visto que os radicais livres podem atuar sobre os lipídios presentes nos alimentos, induzindo o ranço, assim como odores e sabores desagradáveis, o que implica a perda do valor nutricional e comercial do produto. Dessa maneira, o potencial antioxidante é um dos temas mais abordados em relação a pesquisas envolvendo óleos essenciais, uma vez que a oxidação, além de acarretar danos em alimentos, está envolvida com o desencadeamento de muitas patologias (AMORATI; FOTI; VALGIMIGLI, 2013).

Os compostos derivados do metabolismo secundário das plantas ganharam interesse como potencial fonte de moléculas naturais bioativas e são objeto de estudo para possíveis usos como conservante de alimentos, medicamentos alternativos para o tratamento de doenças, controle de micro-organismos, entre outros.

O uso de antioxidantes com a finalidade de prevenir os possíveis danos ocasionados pelos processos oxidativos acentuou-se nos últimos anos, devido ao aumento da incidência de doenças neurodegenerativas causadas em virtude do acúmulo de radicais livres presentes no organismo. Dentre essas doenças, destacam-se o câncer, doenças de Alzheimer e de Parkinson, aterosclerose, doenças inflamatórias, dentre outras.

Diante disso, as neoplasias malignas são a segunda causa de morte na população e, por isso, são consideradas problema de saúde pública. As causas do câncer são diversas e dependem da interação entre a célula e o meio ambiente. Nesse contexto, os fungos

filamentosos em sua decomposição de alimentos, produzem metabólitos secundários que são denominados micotoxinas, e estão relacionadas com a formação de tumores. Assim, alguns fungos produzem micotoxinas que possuem risco carcinogênico ao homem, dependendo da quantidade, duração, via de exposição, sexo, idade e saúde da pessoa exposta (PEREIRA; DOS SANTOS, 2011).

A atividade biológica dos óleos essenciais geralmente está relacionada à sua composição química e aos principais grupos funcionais presentes em sua estrutura. Além disso, os óleos essenciais são uma mistura de componentes químicos que podem agir de modo sinérgico com os constituintes presentes em sua composição. Devido a isso, os constituintes de óleos essenciais são testados na tentativa de encontrar novos compostos bioativos. Ao contrário das drogas sintéticas, os produtos naturais bioativos podem apresentar efeito benéfico no organismo e menor toxicidade. Portanto, os produtos naturais são importantes fontes de descoberta de novos agentes medicinais e devido ao potencial biológico e farmacológico desses compostos, faz-se mister realizar mais estudos que viabilizem a sua aplicação (DZOYEN et al., 2017).

Objetivou-se neste estudo avaliar o potencial antioxidante de constituintes de óleos essenciais por diferentes metodologias, estudar o potencial antitumoral desses compostos sobre linhagens de células de câncer humano, bem como avaliar o potencial antifúngico de determinados constituintes.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Metabolismo secundário dos vegetais

Na natureza, as plantas são expostas a uma variedade de fatores adversos, incluindo fatores de estresse biótico e abiótico, desempenhando um grande impacto nas vias bioquímicas das plantas. Em resposta ao estresse, como radiação UV, salinidade ou exposição a metais pesados, as plantas são capazes de prevenir ou reduzir danos por alteração de seu metabolismo, o que possibilita o crescimento e a reprodução em ambientes adversos (DRESLER et al., 2017).

Marzzoco e Torres (2007) definem o metabolismo como o conjunto de reações químicas catalisadas por enzimas que ocorrem nas células vivas, relacionadas com a transformação de energia. Essas reações apresentam uma determinada vertente, devido à presença de enzimas específicas, de modo a estabelecer as rotas metabólicas, visando ao aproveitamento de nutrientes para satisfazer as exigências fundamentais da célula. No caso dos vegetais, o metabolismo é dividido em primário e secundário (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

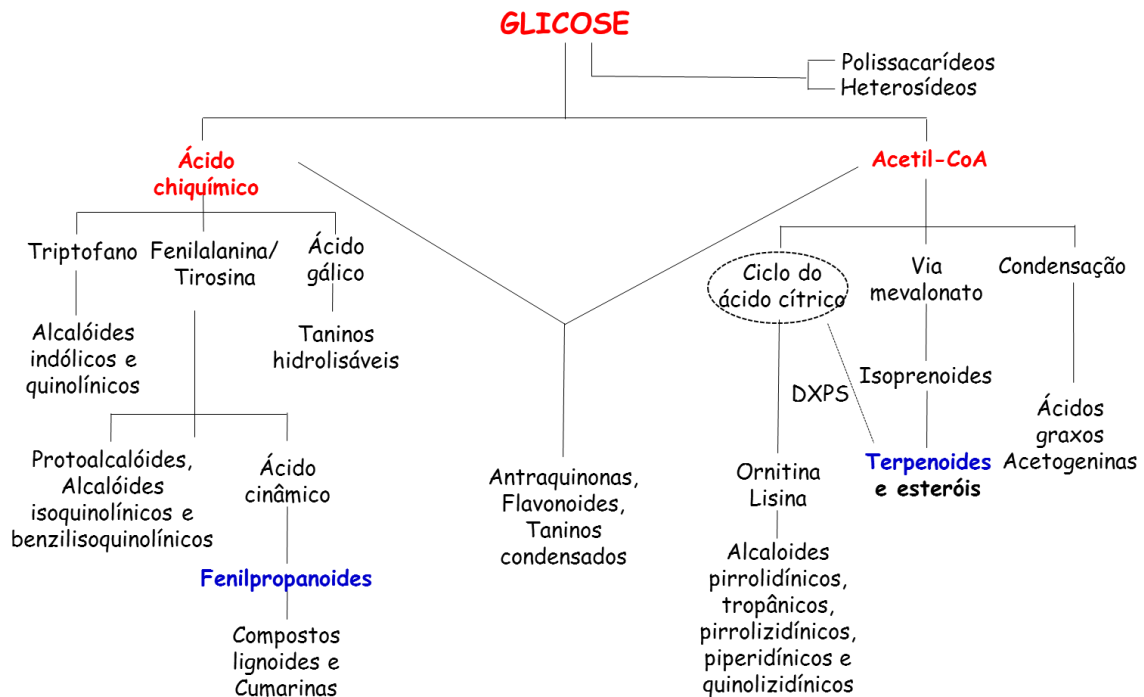
Considerando que os metabólitos primários ocorrem em todas as plantas e exercem função essencial para a sobrevivência, os metabólitos secundários, por sua vez, possuem uma distribuição mais restrita. Com isso, o organismo tem a necessidade de produzir todos os tipos de metabólitos secundários como parte de suas respostas de resistência para a defesa. A biossíntese de metabólitos secundários é complexa e diversa, pois envolve uma série de vias metabólicas (WINK, 2016).

Os metabólitos secundários das plantas constituem um dos grupos mais importantes da classe de metabólitos, com extensas aplicações em alimentos, medicamentos e preparações farmacêuticas. O metabolismo secundário dos vegetais desperta grande interesse devido a tais aplicações crescentes de seus produtos, e há uma tendência nos estudos referentes às vias e reações bioquímicas que utilizam e biossintetizam esses metabólitos secundários de plantas (TIWARI; SANGWAN; SANGWAN, 2016).

Pereira e Cardoso (2012) afirmam que a origem de todos os metabólitos secundários pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais: o ácido chiquímico e o acetil-CoA, de acordo com a Figura 1. O ácido chiquímico é precursor de taninos hidrolisáveis, cumarinas, alcaloides derivados dos aminoácidos aromáticos e fenilpropanoides, compostos que têm em comum a presença de um anel aromático na sua

constituição. Os derivados do acetil-CoA são os aminoácidos alifáticos e os alcaloides derivados deles; terpenoides, esteroides, ácidos graxos e triglicerídeos. Outra rota de biossíntese de terpenos é a 1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXPS).

Figura 1- Rota metabólica de formação dos metabólitos secundários.



Fonte: Adaptado de Simões et al. (2007).

2.2 Óleos essenciais

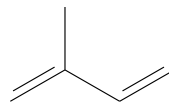
Os metabólitos secundários vegetais destacam-se na área da farmacologia devido a seus efeitos biológicos sobre a saúde da espécie humana. Dentre os diversos metabólitos secundários produzidos pelas plantas, destacam-se os óleos essenciais, que são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos, revelando grande importância terapêutica. A maioria dos óleos essenciais é incolor ou ligeiramente amarelado e apresentam densidade menor que a água; quimicamente, são derivados de terpenos, fenilpropanoides e compostos oxigenados (ALEKSIC; KNEZEVIC, 2014).

Os óleos essenciais são sintetizados em estruturas secretoras, em que a secreção é formada em glândulas endógenas que eventualmente se rompem e liberam substâncias na cavidade dessas estruturas. Esses óleos podem estar envolvidos nas interações animal-planta, planta-micro-organismos e planta-planta, com a finalidade de sobrevivência e/ou manutenção

da planta, conferindo a ela capacidade de adaptação às condições do meio em que vive, como maior proteção contra predadores, funções ecológicas e efeitos alelopáticos com outras plantas. Diversos fatores influenciam a composição química dos óleos essenciais e suas propriedades biológicas, tais como a espécie, parte da planta, origem geográfica e método de extração. Essa variação da produção e composição química também pode ser modificada por fatores ambientais como índice pluviométrico, temperatura, radiação solar, sazonalidade, tipo de solo e altitude (CASTRO et al., 2008; GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Os componentes dos óleos essenciais podem ser classificados em terpenos e fenilpropanoides. Os terpenos constituem a maior classe de produtos naturais, sintetizados no citoplasma das células da planta e sua síntese ocorre por meio da via do ácido mevalônico a partir da molécula de acetil-CoA. São formados a partir da unidade isoprênica (2-metil-1,3-butadieno) (Figura 2) e encontrados nos óleos essenciais predominantemente sob as formas de monoterpenos ($C_{10}H_{16}$), formados por meio da condensação de duas unidades isoprênicas; e sesquiterpenos, com a união de três unidades isoprênicas ($C_{15}H_{24}$) (SIMÕES et al., 2007).

Figura 2 – Estrutura química do isopreno.



Fonte: Do autor (2018)

A biossíntese dos terpenos envolve dois precursores fundamentais: o isopentenil difosfato (IPP) e o dimetilalil difosfato (DMAPP). Nas plantas superiores, o IPP pode ser biossintetizado por meio de duas vias: a via do mevalonato, que ocorre no citosol, e a via da 1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXPS), que se passa nos plastídios. Na primeira via, três moléculas de acetil-coA são unidas por algumas reações, a fim de formar o ácido mevalônico que, por sucessivas reações de fosforilação, forma-se o isopentenil difosfato (IPP). Com o auxílio de uma isomerase, o IPP é rapidamente transformado em DMAPP e, por consecutivas reações, os compostos terpênicos são formados, conforme a Figura 3.

Figura 3– Biossíntese dos terpenos pela via do mevalonato. (Continua)

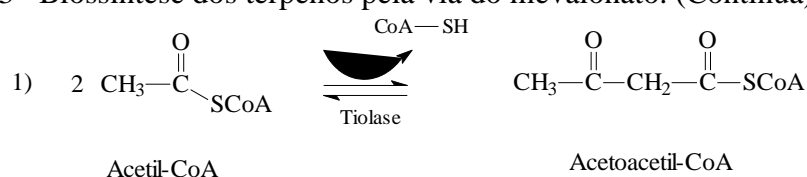


Figura 3 – Biossíntese dos terpenos pela via do mevalonato. (Continua)

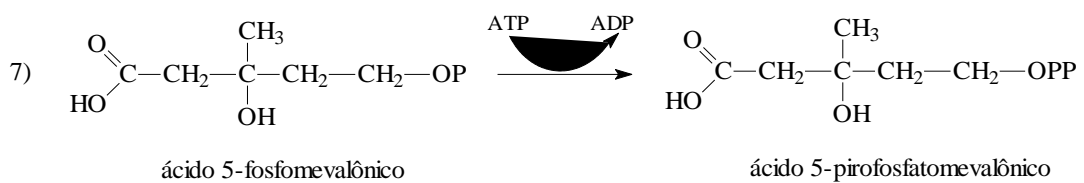
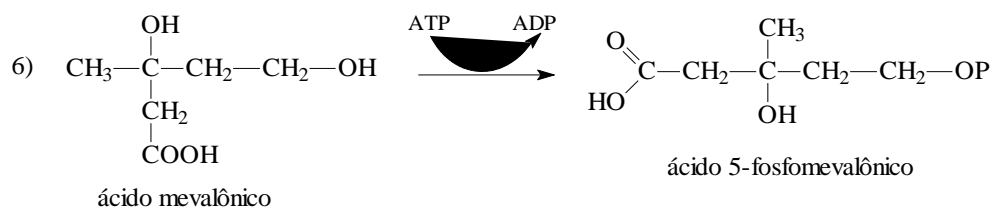
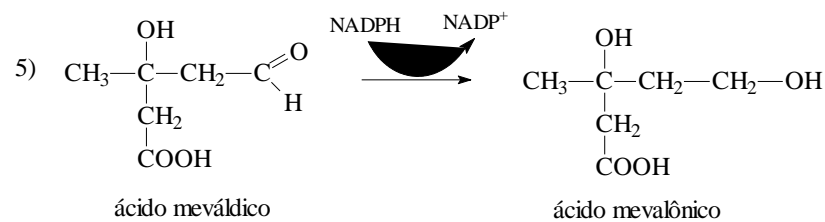
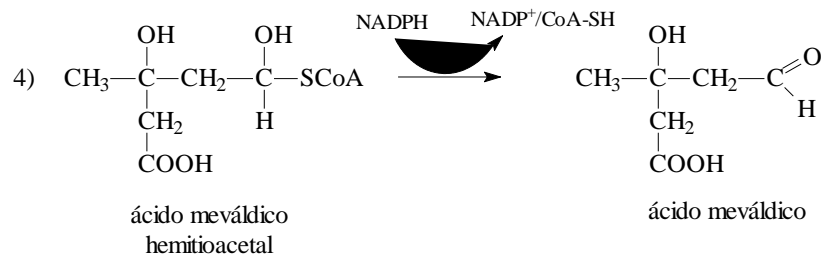
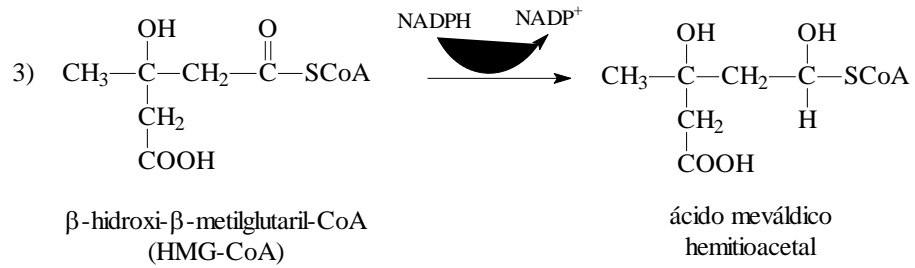
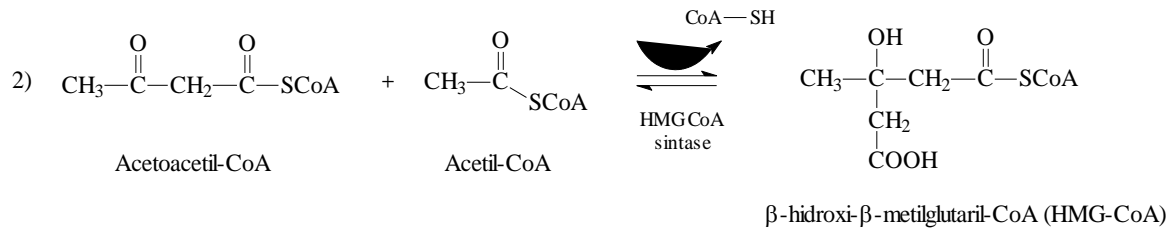


Figura 3 – Biossíntese dos terpenos pela via do mevalonato. (Continua)

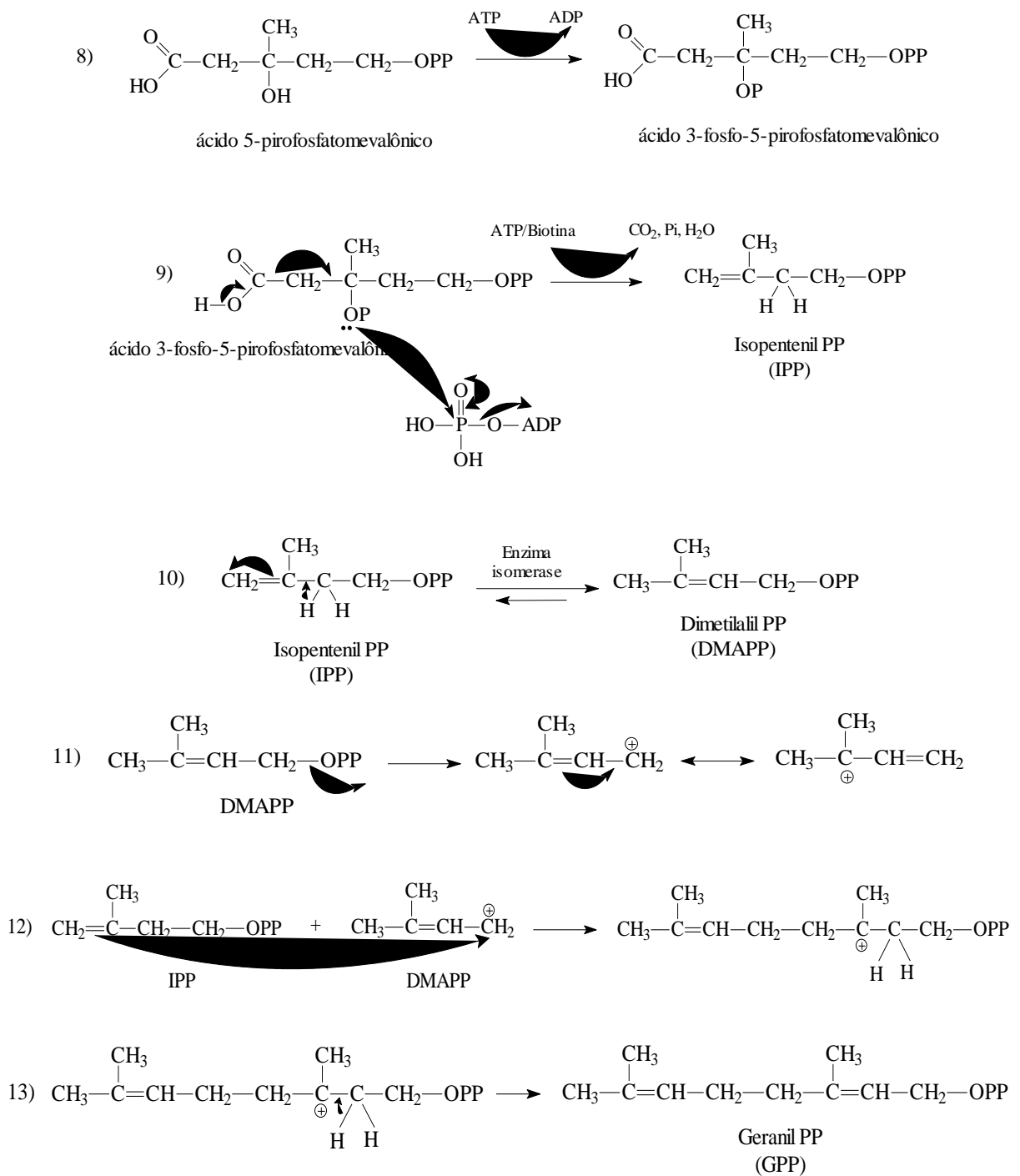
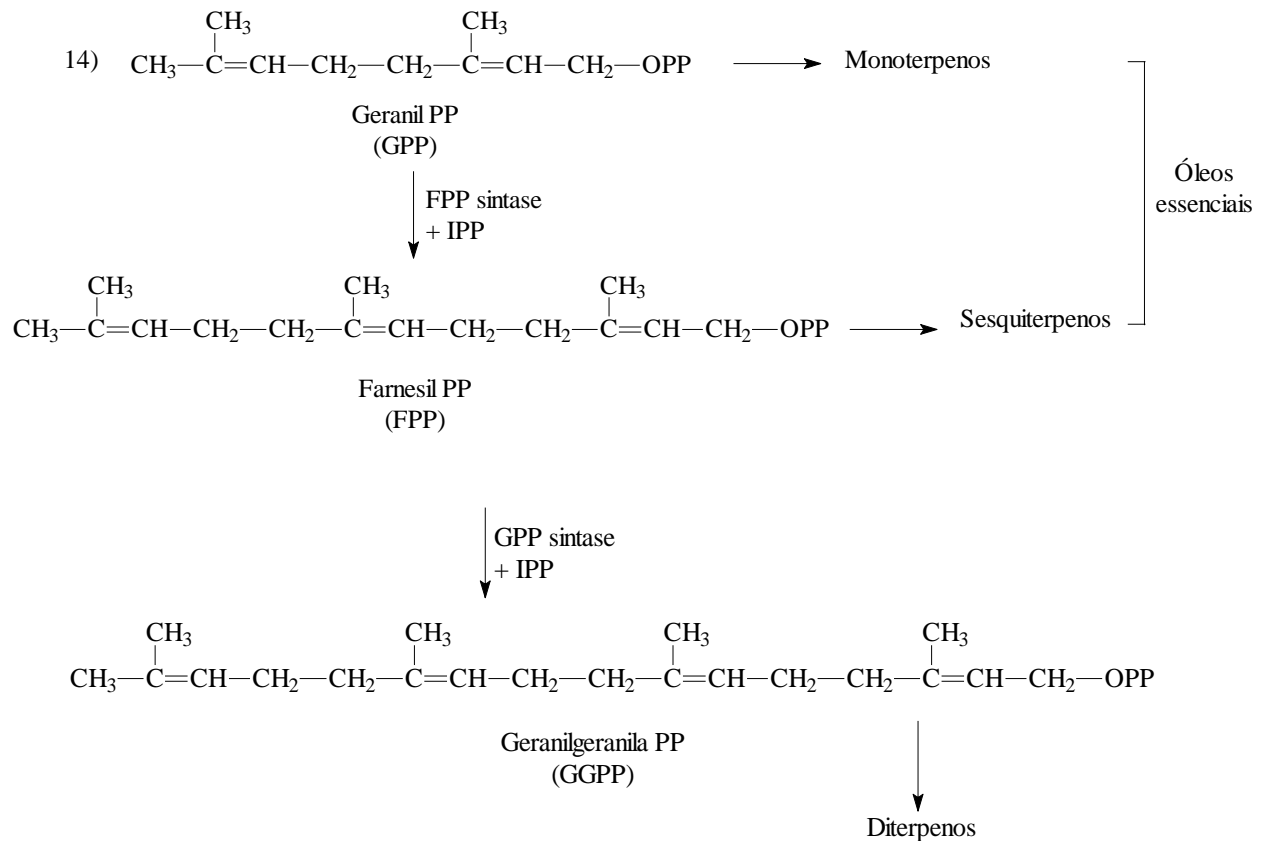


Figura 3 – Biossíntese dos terpenos pela via do mevalonato. (Conclusão)



Fonte: Teixeira (2016).

Por outro lado, na rota do DXPS, o ácido pirúvico e o gliceraldeído-3-fosfato formam o DXPS que, posteriormente, origina o 2-C-metil-D-eritrol-4-fosfato (MEP). Por meio de sucessivas reações, formam-se o isopentenil difosfato (IPP) e o dimetilalil difosfato (DMAPP) (Figura 4). Mediante a condensação das unidades pentacarbonadas formadas, o IPP e DMAPP, outros compostos terpênicos são sintetizados (DEWICK, 2009; SIMÕES et al., 2007).

Figura 4- Biossíntese dos terpenos via DXPS. (Continua)

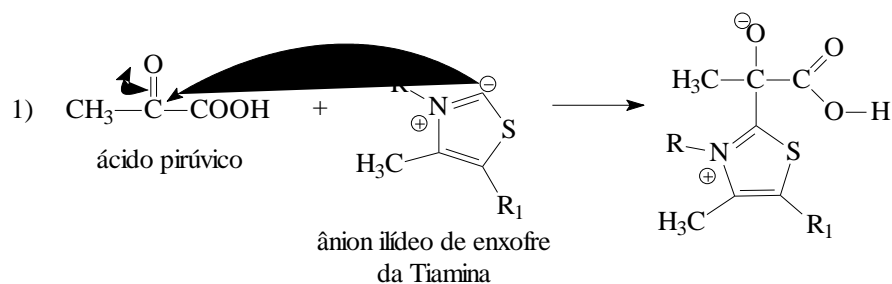


Figura 4- Biossíntese dos terpenos via DXPS. (Continua)

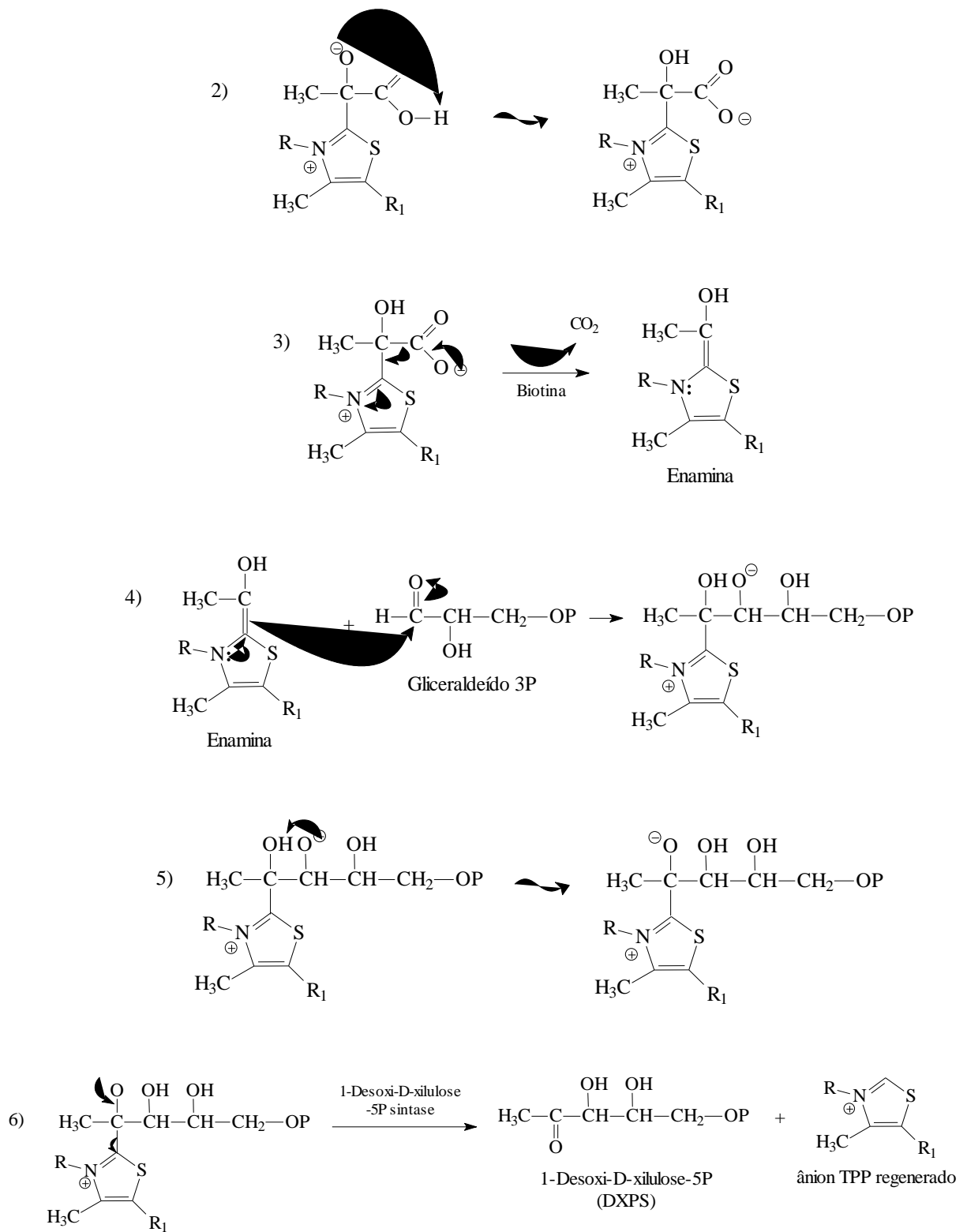


Figura 4- Biossíntese dos terpenos via DXPS. (Continua)

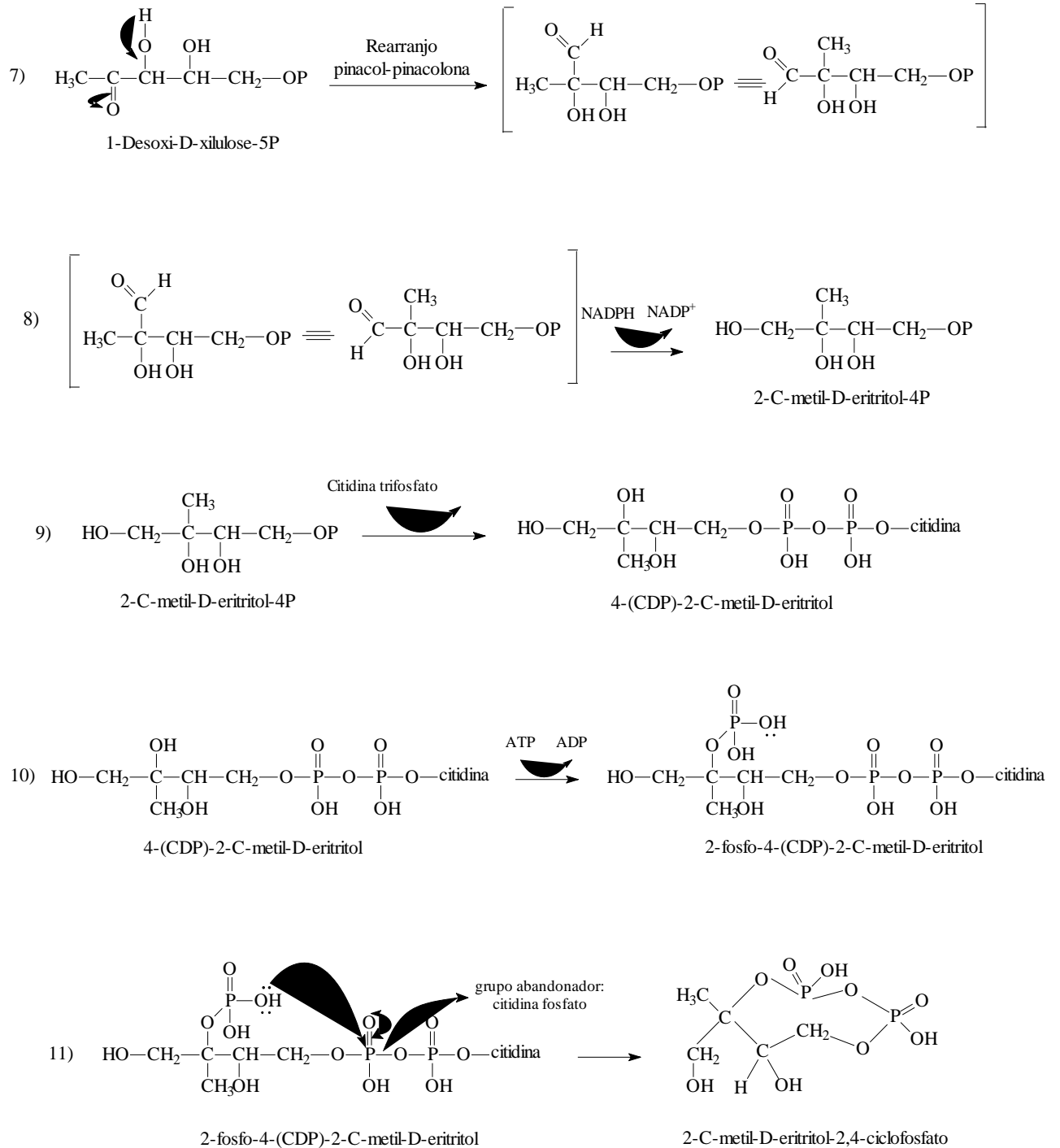
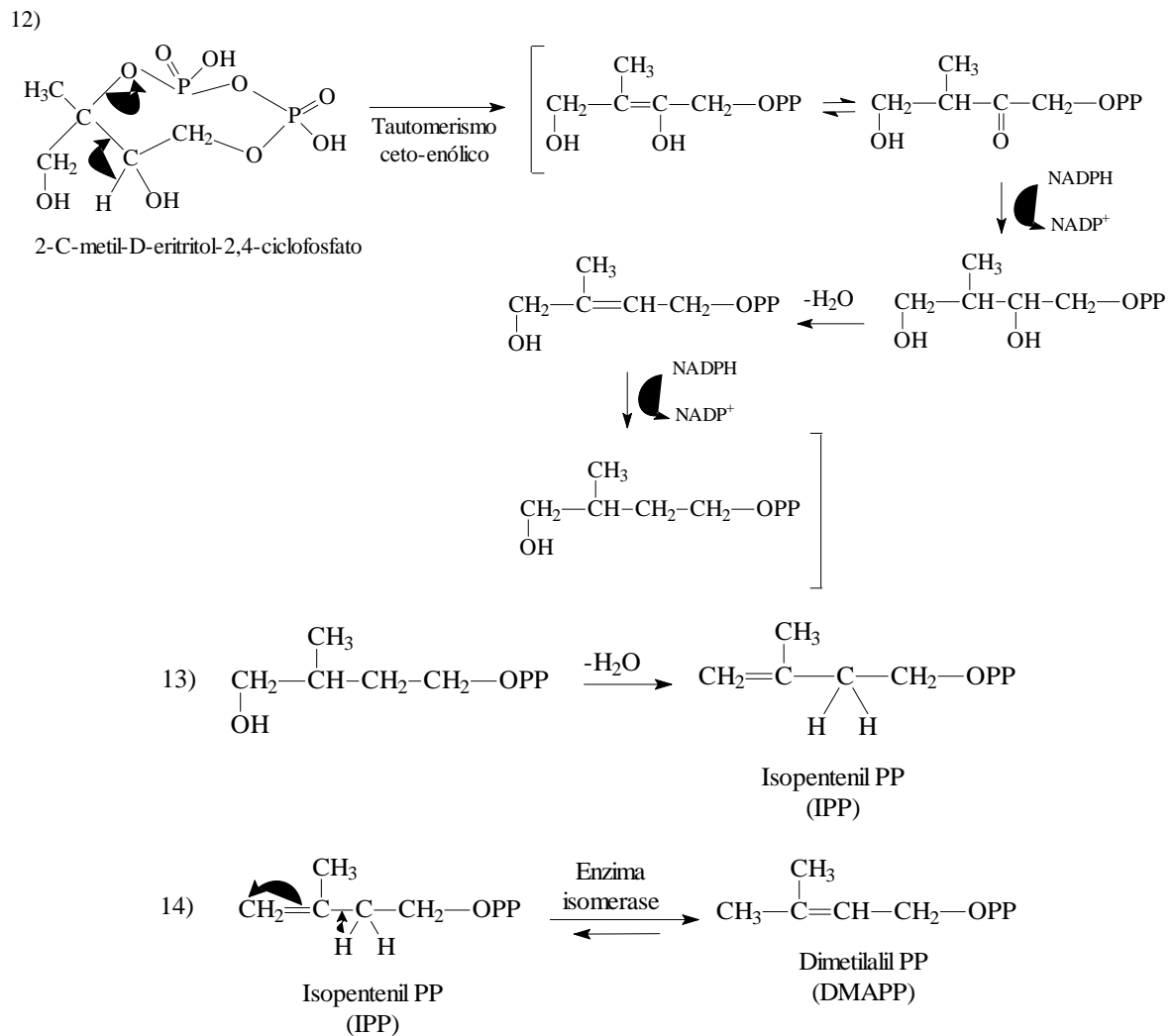


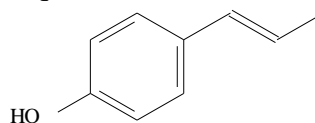
Figura 4- Biossíntese dos terpenos via DXPS. (Conclusão)



Fonte: Teixeira (2016).

Os fenilpropanoides são compostos naturais amplamente distribuídos nos vegetais e caracterizados por apresentarem um anel benzênico unido a uma cadeia lateral com três átomos de carbono (C₆-C₃) (Figura 5). São derivados biossinteticamente do ácido chiquímico, formado pela condensação de dois metabólitos da glicose: o fosfoenolpiruvato e a eritrose-4-fostato (ALEKSIC; KNEZEVIC, 2014).

Figura 5- Representação química básica de um fenilpropanoide.



Fonte: Do autor (2018).

A condensação de uma molécula de fosfoenolpiruvato e uma molécula de eritrose-4-fosfato origina o ácido chiquímico. A eliminação de um álcool da molécula de ácido chiquímico, juntamente com a adição de uma molécula de fosfoenolpiruvato, originam o ácido corísmico. A partir desse são originados aminoácidos aromáticos, como a fenilalanina e a tirosina que, por meio da enzima fenilalanina amonialiase (FAL), perdem uma molécula de amônia, resultando na formação dos ácidos cinâmico e *p*-cumárico. Assim, por sucessivas reações de redução enzimática, oxidação com degradação da cadeia lateral e ciclização aromática intramolecular, originam-se os fenilpropanoides, compostos presentes na constituição química de muitos óleos essenciais, conforme demonstrado na Figura 6 (SIMÕES et al., 2007).

Figura 6- Mecanismo de formação da estrutura básica dos fenilpropanoides. (Continua)

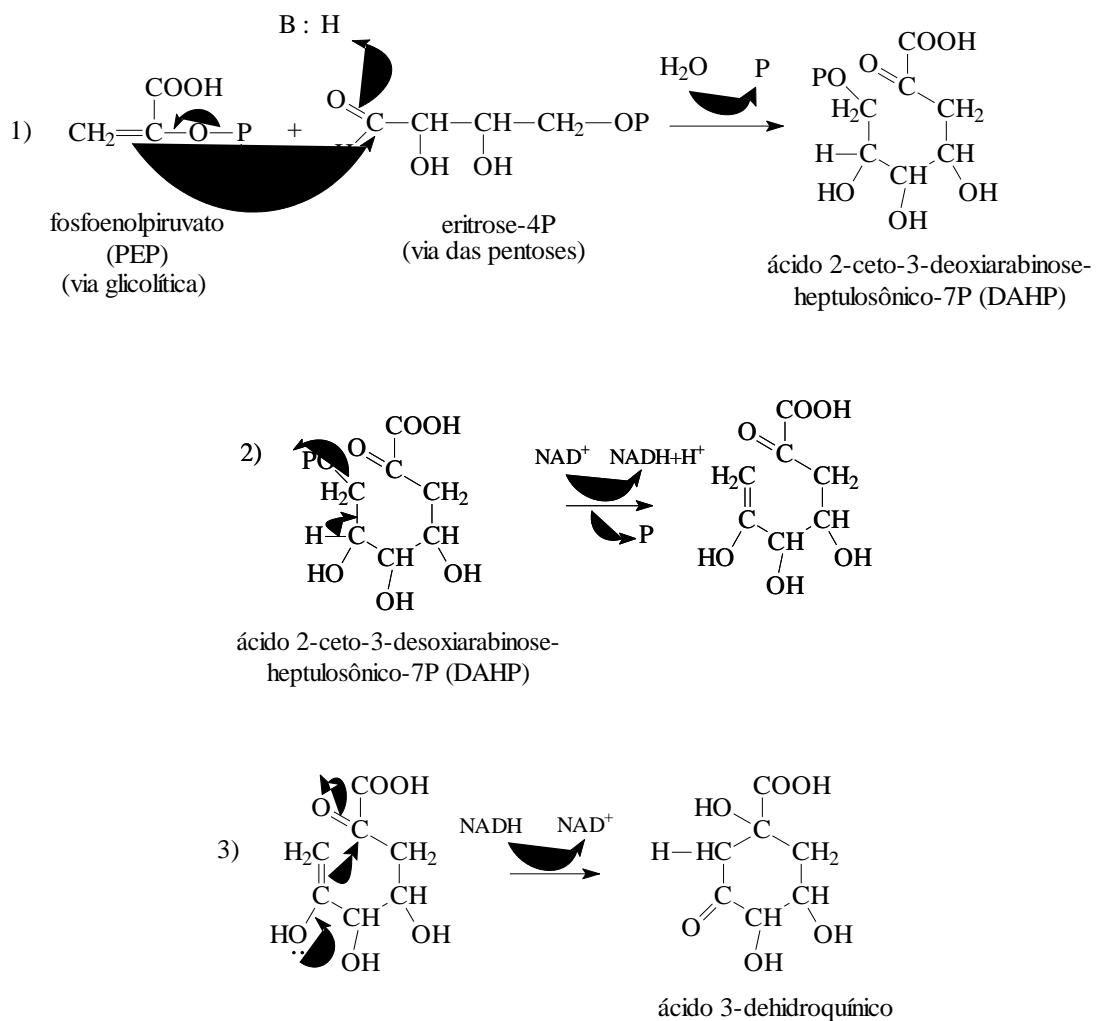


Figura 6 - Mecanismo de formação da estrutura básica dos fenilpropanoides. (Continua)

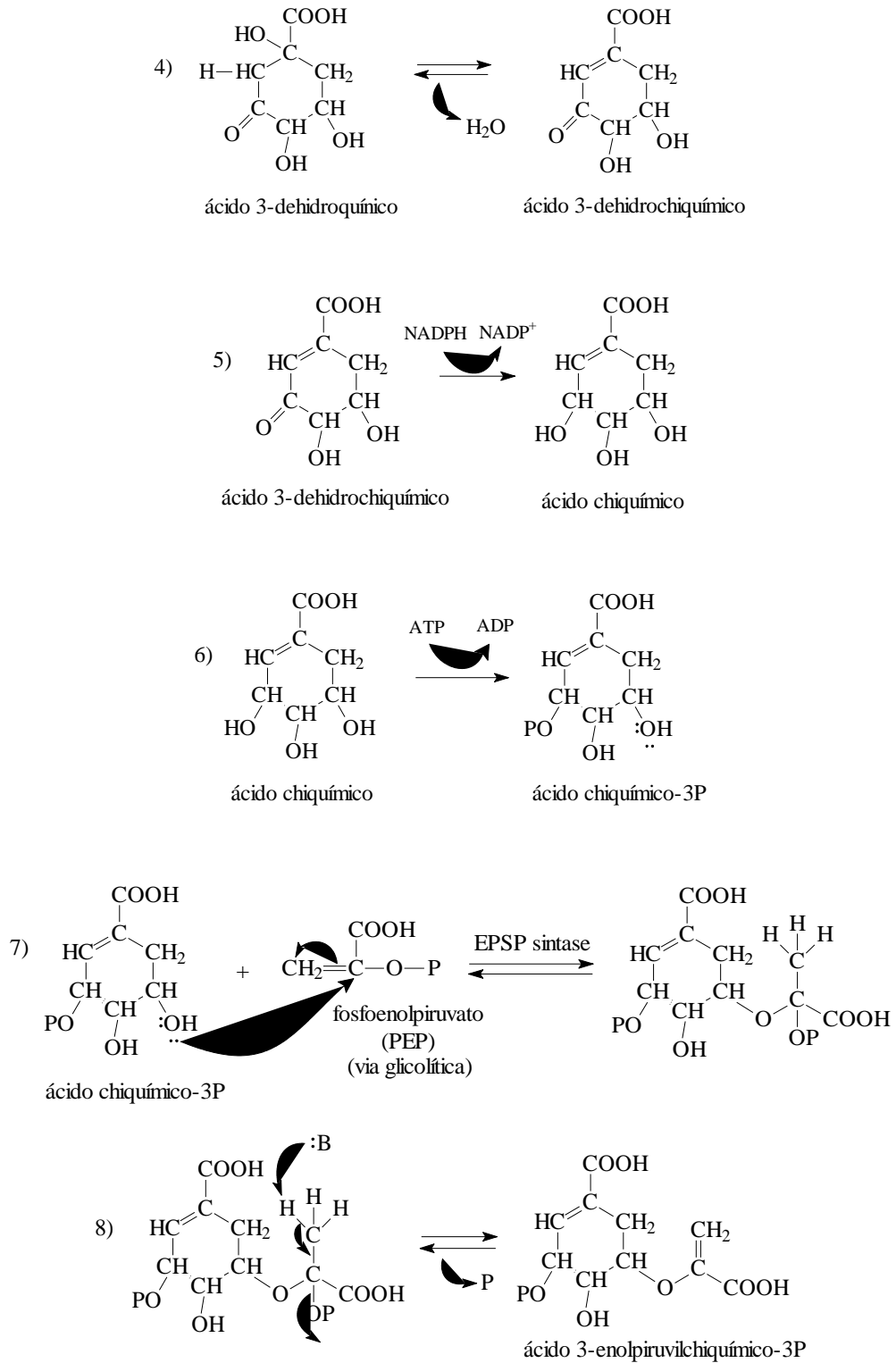
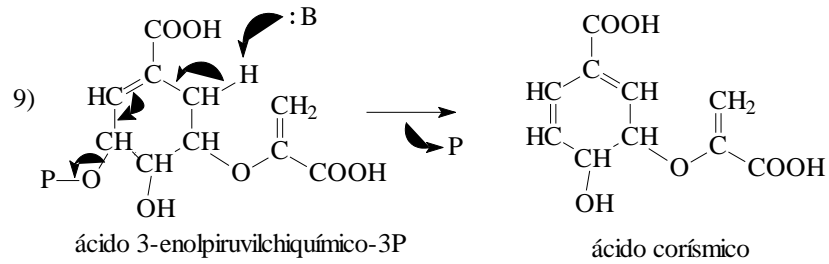


Figura 6 - Mecanismo de formação da estrutura básica dos fenilpropanoides. (Continua)



Síntese do aminoácido fenilalanina

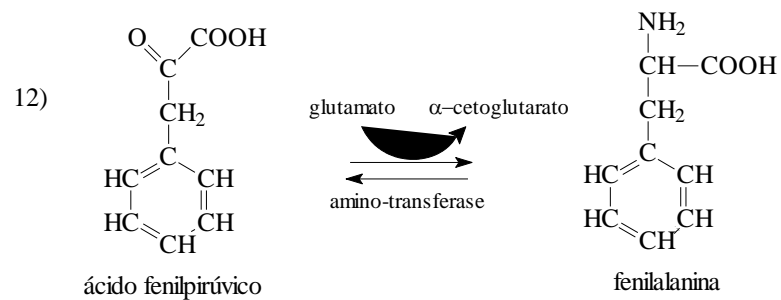
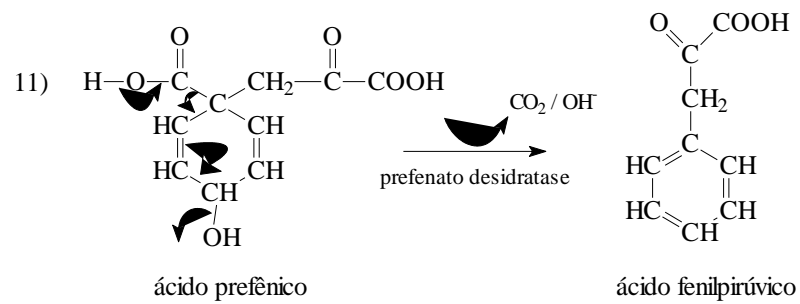
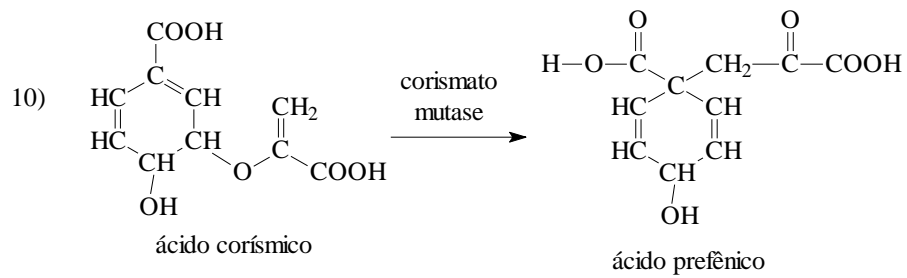


Figura 6 - Mecanismo de formação da estrutura básica dos fenilpropanoides. (Continua)

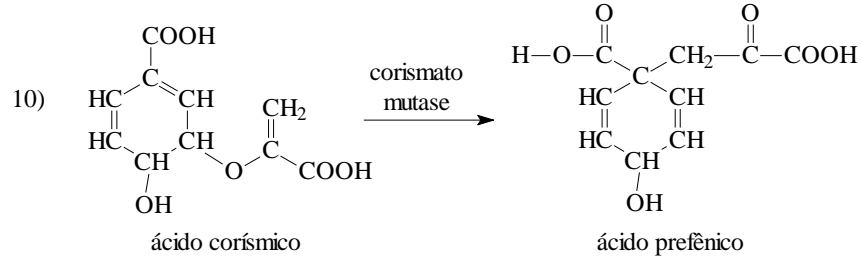
Síntese do aminoácido tirosina

Figura 6 - Mecanismo de formação da estrutura básica dos fenilpropanoides. (Conclusão)

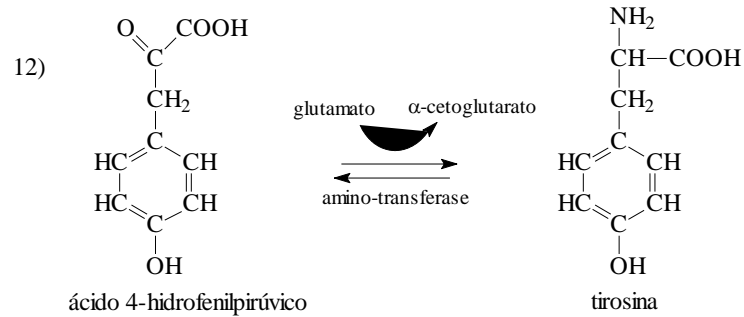
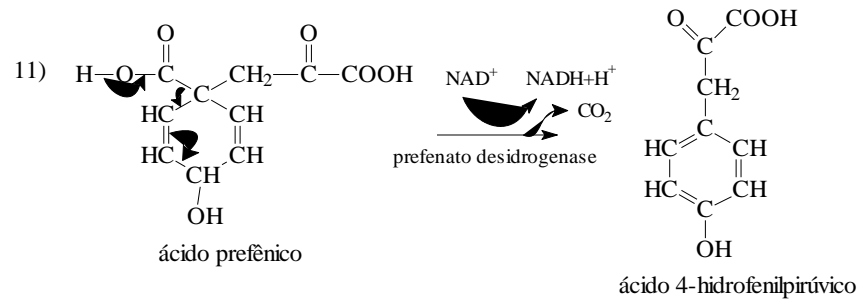
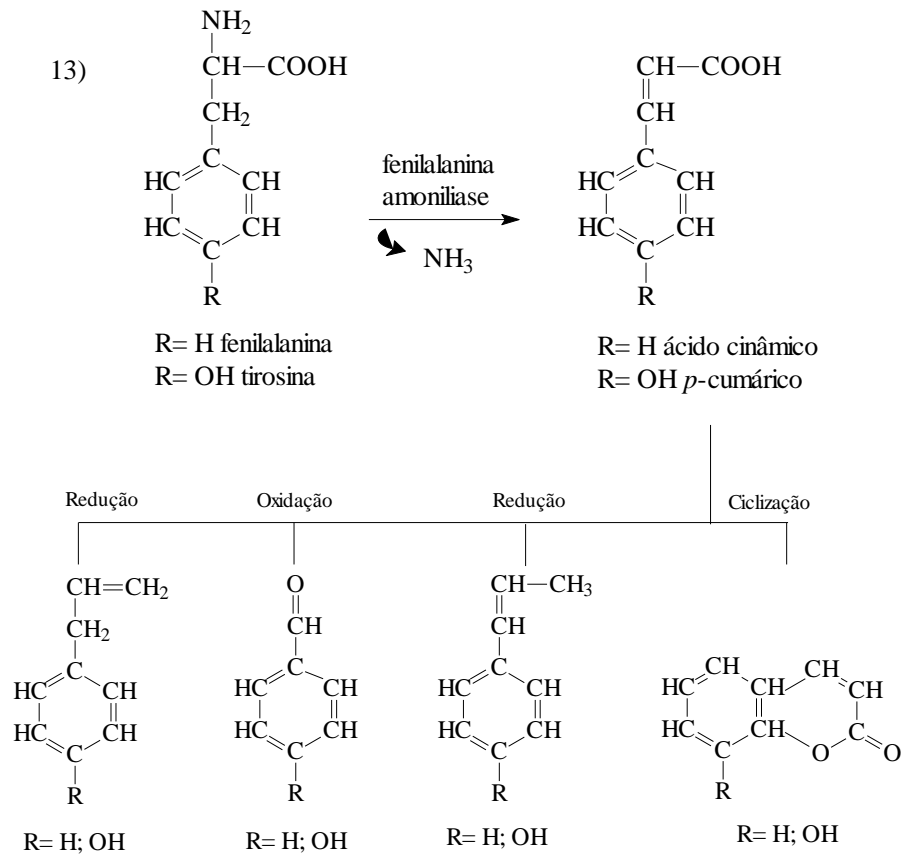


Figura 6 - Mecanismo de formação da estrutura básica dos fenilpropanoides. (Conclusão)

Síntese dos fenilpropanoides a partir dos aminoácidos fenilalanina e tirosina



Fonte: Teixeira (2016).

No passado, a maioria dos óleos essenciais era estudada apenas no aspecto do aroma e da química das fragrâncias em alimentos aromáticos e bebidas. Hodiernamente, os óleos essenciais e seus constituintes têm adquirido maior destaque devido à sua posição como produto natural, grande aceitação pelos consumidores, potencial de uso multifuncional e aos riscos potenciais dos aditivos sintéticos. De fato, em muitos estudos têm-se relatado propriedades antioxidantes de óleos essenciais, referindo-os como potenciais substitutos para os antioxidantes sintéticos e, em alguns casos, sugerindo-os para uma aplicação direta em alimentos, lavouras, produtos farmacêuticos e cosméticos (MIRANDA et al., 2014).

A utilização de óleos essenciais e dos seus componentes isolados são novas abordagens para aumentar a sua eficácia, além dos efeitos sinérgicos e aditivos (ADRAR; OUKIL; BEDJOU, 2016). Nesse sentido, pesquisas em diversas espécies de plantas, bem como estudos acerca da eficácia de seus compostos, são crescentes, a fim de encontrar novas substâncias bioativas naturais presentes nelas.

2.2.1 Potencial biológico dos óleos essenciais e de seus constituintes

Nos últimos anos, intensificou-se a busca dos consumidores por produtos de origem natural e menos tóxicos à saúde. Com isso, os óleos essenciais e seus compostos isolados têm sido utilizados em todo o mundo, principalmente nas indústrias farmacêuticas, agrícolas, alimentícias e cosméticas, de modo que seu uso está aumentando constantemente nessas áreas, como alternativa aos aditivos sintéticos.

Os óleos essenciais são de interesse científico e popular, uma vez que podem atuar sinergicamente com outros compostos empregados em técnicas de preservação e geralmente são reconhecidos como seguros. Além disso, apresentam propriedades farmacológicas variadas, tais como antioxidante, antimicrobiana, antitumoral, antisséptica, anti-inflamatória, inseticida, que são promissoras em relação ao seu uso como compostos bioativos em diferentes substratos (ANDRADE et al., 2012; SILVA et al., 2015; TEIXEIRA et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2014).

O potencial antioxidante dos óleos essenciais e de seus constituintes pode ser evidenciado em diversos estudos, com a finalidade de prevenir a oxidação lipídica e prolongar o tempo de vida útil dos produtos de prateleira. Além disso, têm a capacidade de eliminar os radicais livres, mostrando-se importantes em algumas doenças, como a disfunção cerebral, câncer, doença cardíaca e declínio do sistema imunológico, visto que essas doenças podem resultar de danos celulares causados por radicais livres (AMORATI; FOTI; VALGIMIGLI, 2013; MIGUEL, 2010a; SINGH et al., 2012).

Zengin e Baysal (2014) avaliaram a atividade antibacteriana e antioxidante de constituintes terpênicos provenientes de óleos essenciais. Os compostos analisados foram o α -terpineol, eucaliptol e linalol pelos métodos do poder antioxidante de redução do ferro (FRAP) e sequestro de radicais DPPH. Os autores observaram que o eucaliptol exibiu fraca atividade antioxidante pelo método do FRAP e praticamente nenhuma atividade pelo método do sequestro de radicais livres DPPH, confirmando que a atividade antioxidante é influenciada por diferentes ensaios.

Diversos estudos revelam o potencial antitumoral de óleos essenciais de diferentes plantas, bem como de seus constituintes isolados, visto que esses compostos atuam na inibição do ciclo celular ou na apoptose de células cancerígenas. Os fenilpropanoides são largamente utilizados em estudos que envolvem relação estrutura-atividade, especialmente devido a presença de grupos funcionais que são alvos de transformações químicas que objetivam a formação de estruturas derivadas relacionadas. Assim, o eugenol, por exemplo, é

um fenilpropanoide que possui várias atividades farmacológicas e aplicações nas indústrias farmacêuticas, alimentícias e cosméticas (CAVALCANTI; DE OLIVEIRA; DE SOUSA, 2015).

Nikolić e colaboradores (2014) investigaram a atividade antitumoral dos óleos essenciais de *Thymus serpyllum*, *Thymus algeriensis* e *Thymus vulgaris* sobre o crescimento de cinco linhagens de células tumorais humanas (NCI-H460, MCF-7, HCT-15 e AGS). Os óleos essenciais testados apresentaram como constituinte majoritário o timol, e, dentre esses, o óleo essencial de *T. serpyllum* apresentou maior eficácia contra as linhagens testadas. A linhagem celular HCT-15 (carcinoma de cólon) mostrou-se mais susceptível ao ataque dos óleos essenciais, ao passo que a linhagem MCF-7 (adenocarcinoma de mama) revelou-se mais resistente.

Os constituintes químicos dos óleos essenciais estão sendo cada vez mais estudados, e diversos são os trabalhos que relatam sua aplicabilidade nas diversas áreas da indústria, com destaque para o controle de micro-organismos. Nos dias atuais, a infecção por fungos é de grande risco para os seres humanos, produzindo micotoxinas que apresentam potencial carcinogênico, além de reduzir ou destruir o valor nutritivo de alimentos, grãos e folhas durante o armazenamento. Dessa forma, numerosos óleos essenciais e seus constituintes são investigados por suas propriedades antimicrobianas sobre diferentes fungos (NIETO, 2017).

Abbaszadeh e colaboradores (2014) analisaram o efeito antifúngico do timol, carvacrol, eugenol e mentol como alternativa ao controle do crescimento de diversos fungos relevantes para os alimentos. Os resultados indicaram que os compostos estudados foram eficazes em diferentes proporções sobre os vários fungos abordados; o carvacrol exibiu maior potencial antifúngico, apresentando uma concentração mínima inibitória (CMI) média de (154,5 µg/mL). Além disso, o aumento na concentração dos compostos avaliados induziu a uma redução progressiva e significativa no crescimento dos fungos.

Portanto, com base nas propriedades biológicas destacadas, pode-se afirmar que tanto os óleos essenciais quanto os seus constituintes ganharam interesse como fontes potenciais de moléculas naturais bioativas. Ademais, tornaram-se objeto de estudo para o seu possível uso como conservante, medicamento alternativo e antimicrobiano, uma vez revelados seu potencial antioxidante, antitumoral e antifúngico, respectivamente.

2.3 Radicais livres

A transferência de elétrons é um dos processos químicos fundamentais para a sobrevivência das células. Um dos efeitos colaterais dessa dependência é a produção de radicais livres (RL) e outras espécies reativas ao oxigênio (ERO'S), constantemente formados como resultado do metabolismo celular humano, podendo causar dano oxidativo (ALVES et al., 2010).

Os RL são átomos ou espécies radicalares que apresentam pares de elétrons desemparelhados em sua camada externa, produzidos por processos metabólicos, atuando como mediadores para a transferência de elétrons em várias reações bioquímicas. Possuem diferentes funções no organismo e encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. Além disso, são altamente instáveis e reativos, capazes de danificar moléculas biologicamente relevantes, como o DNA, proteínas, carboidratos e lipídios (PEREIRA; CARDOSO, 2012; VASCONCELOS et al., 2014).

Os RL podem se combinar com outras moléculas do corpo e serem aniquilados rapidamente, caso sua produção seja pequena. Entretanto, quando uma grande quantidade é liberada em diferentes situações, tais como em caso de excesso de exercícios físicos, elevada exposição ao sol, tabagismo, ingestão de alimentos com muita fritura e refinados, pode apresentar efeitos deletérios, como o envelhecimento precoce, doenças neurodegenerativas, entre outras que influenciam diretamente a qualidade de vida (VASCONCELOS et al., 2014).

A maior parte dos radicais livres apresenta um tempo de meia-vida muito curto, que varia de nanossegundos a minutos. Devido a isso, reagem rapidamente com vários compostos e podem entregar seu elétron não pareado ou capturar um elétron de outra molécula, a fim de formar um par. Assim, os radicais tornam-se estáveis, mas a molécula atacada transforma-se em um novo radical, dando origem a reações em cadeia bastante danosas (COTINGUIBA et al., 2013).

Entre os principais radicais livres, encontram-se o radical hidroxil ($\text{OH}\cdot$), ânion superóxido (O_2^-), radical peróxil ($\text{ROO}\cdot$), radical alcóxil ($\text{RO}\cdot$) e óxido nítrico (NO). Os radicais $\text{OH}\cdot$ e O_2^- possuem maior importância biológica, pois são formados durante as reações metabólicas ou acentuados por causa da redução de oxigênio molecular (O_2) no interior das mitocôndrias. O peróxido de hidrogênio, apesar de não ser considerado um radical livre, é capaz de atravessar a membrana nuclear e induzir danos à molécula de DNA por meio de reações enzimáticas. Destaca-se que, embora o O_2 seja necessário para o desempenho das funções celulares, ele induz inevitavelmente à formação de espécies reativas de oxigênio, ainda que não seja um radical livre (COTINGUIBA et al., 2013).

O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a formação e a remoção de espécies radicalares, seja em razão da geração excessiva de radicais livres, seja em detrimento da velocidade de remoção desses pelos antioxidantes. Tal processo conduz à oxidação de biomoléculas essenciais, como proteínas, DNA e lipídios com consequente perda de suas funções biológicas e desequilíbrio homeostático, cuja manifestação pode resultar em morte celular (PISOSCHI; POP, 2015).

Com a finalidade de combater o excesso de radicais livres produzidos pelo organismo, bem como evitar o estresse oxidativo, tem-se cada vez mais empregado compostos com propriedades antioxidantes. Estes podem ser provenientes da dieta ou mesmo sintéticos, sendo largamente empregados nas indústrias de alimentos, cosméticos, bebidas e também na medicina, visto que, muitas vezes, os próprios medicamentos aumentam a geração intracelular desses radicais.

2.4 Antioxidantes

2.4.1 Sistema de defesa antioxidante

Os antioxidantes são agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células. De modo geral, qualquer substância que esteja presente em menores concentrações, quando comparada ao substrato oxidável e que possua a capacidade de retardar ou impedir a oxidação desse substrato de modo eficaz, é denominada antioxidante (SUCUPIRA et al., 2012).

A ação antioxidante resulta em reduções do estresse oxidativo, mutações no DNA, transformações malignas, assim como outros parâmetros que provocam danos celulares. Além disso, os antioxidantes são capazes de controlar os efeitos das espécies reativas ao oxigênio e diminuir a incidência de câncer e outras doenças degenerativas (PISOCHI; POP, 2015).

As defesas antioxidantes podem ser provenientes tanto de fontes endógenas quanto de fontes exógenas. O mecanismo de defesa antioxidante atua por meio de diversos níveis de proteção, que podem ser resumidos em três formas principais de atuação: prevenção, a fim de impedir a formação dos radicais livres e espécies não radicais; interceptores, com o intuito de inibir a ação dessas espécies reativas e, por fim, como sistemas de reparo, para reconstituir as estruturas biológicas danificadas (BARBOSA et al., 2010).

O sistema celular de defesa antioxidante inicia-se com uma cascata enzimática, mas compreende também compostos não enzimáticos, a fim de neutralizar a citotoxicidade das ERO's. A atividade enzimática está relacionada àqueles compostos capazes de bloquear a

oxidação, ou seja, as enzimas que removem as espécies reativas ao oxigênio, tais como a glutatona, catalase e peróxido dismutase. As enzimas antioxidantes convertem produtos oxidativos em H_2O_2 e, posteriormente, em H_2O , na presença de cofatores, como cobre, zinco, manganês e ferro. A atividade não enzimática inclui especialmente os compostos de origem dietética e diz respeito às moléculas que interagem com as espécies radicalares e são consumidas durante a reação. Nessa classificação, estão inseridos os antioxidantes naturais e sintéticos, como β -caroteno, ácido ascórbico e α -tocoferol (NIMSE; PAL, 2015; OLIVEIRA; SCHOFFEN, 2010).

Conforme seu modo de ação, os antioxidantes podem ser classificados em primários e secundários. Os primários são responsáveis por interromper a cadeia da reação por meio da doação de elétrons ou átomos de hidrogênio aos RL, formando um novo radical mais estável. Com relação aos secundários, podem reagir com os radicais da etapa de iniciação ou inibir as enzimas dessa etapa ou reduzir o nível de oxigênio, sem gerar espécies radicalares reativas. Logo, esses antioxidantes secundários podem retardar as etapas de iniciação da auto-oxidação por meio da eliminação de iniciadores. Assim, são capazes de atuar por diversos mecanismos, como a complexação de metais, sequestro de oxigênio, decomposição de hidroperóxidos para formar espécie não radical, absorção da radiação ultravioleta ou desativação de oxigênio singleto (COTINGUIBA et al., 2013; MIGUEL, 2010b).

2.4.2 Antioxidantes naturais

Cada vez mais, os consumidores estão preocupados com a saúde e buscam hábitos de vida mais saudáveis, com interesse em alimentos que possuam ingredientes bioativos ou funcionais que agregam valor nutricional a eles. As reações de oxidação podem ser evitadas dependendo das condições ambientais ou por meio da utilização de compostos com propriedades antioxidantes, uma vez que a ingestão de alimentos com potencial antioxidante auxilia na prevenção da oxidação oriunda dos processos biológicos.

Com o intuito de prolongar a estabilidade de armazenamento dos alimentos, os antioxidantes sintéticos são largamente empregados durante o processamento industrial. Entretanto, os efeitos secundários de alguns antioxidantes sintéticos, tais como butil hidroxitolueno (BHT), butil hidroxianisol (BHA), galato de propila (PG) e tert-butil-hidroquinona (TBHQ) indicam risco toxicológico. Devido aos efeitos negativos provocados por esses antioxidantes, torna-se crescente o interesse dos consumidores por antioxidantes naturais. O uso de antioxidantes naturais, com o propósito de prolongar o tempo de vida dos

produtos de prateleira, bem como retardar a oxidação dos alimentos gordurosos na indústria alimentícia, tem aumentado significativamente nos últimos anos (FALOWO; FAYEMI; MUCHENJE, 2014; KARRE; LOPEZ; GETTY, 2013).

Vários compostos presentes em plantas possuem capacidade antioxidante, como as vitaminas, clorofilina, curcumina, flavonoides e também alguns óleos essenciais. Os óleos essenciais e seus componentes isolados estão sendo cada vez mais estudados como agentes antioxidantes e tornaram-se uma alternativa viável para substituir ou associar-se aos antioxidantes convencionais, a fim de minimizar a quantidade dessas substâncias consideradas maléficas à saúde. Dessa maneira, diante da possibilidade de empregar os óleos essenciais e seus constituintes na indústria de alimentos, na indústria farmacêutica e também cosmética, numerosos estudos têm se dedicado a demonstrar o potencial farmacológico e biológico desses compostos (SUCUPIRA et al., 2012).

Dawidowicz e Olszowy (2014) relataram as semelhanças e diferenças entre as atividades antioxidantes de alguns óleos essenciais e dos seus principais componentes pelos métodos do sequestro do radical DPPH e β -caroteno/ácido linoleico. Verificaram que os dados obtidos evidenciam que as propriedades antioxidantes do óleo essencial nem sempre dependem da atividade antioxidante do seu componente principal e que podem ser moduladas pelos seus outros componentes. Além disso, as conclusões relativas à interação dos componentes do óleo essencial dependem do tipo de método utilizado para avaliar a atividade antioxidante. Ao comparar as propriedades antioxidantes dos óleos essenciais e seus principais componentes, os conceitos de sinergismo e antagonismo são relevantes.

A capacidade antioxidante dos óleos essenciais é avaliada por diversos autores, empregando-se métodos variados. Dessa forma, estudos com a finalidade de exibir uma visão geral acerca dos métodos mais utilizados bem como elucidar a química envolvida nessas técnicas são de suma importância na literatura (EMBUSCADO, 2015; LÓPEZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013; MIGUEL, 2010a; SHAHIDI; ZHONG, 2015).

2.4.3 Métodos espectrofotométricos para a determinação da atividade antioxidante *in vitro*

Existem diversos métodos disponíveis na literatura científica para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de substâncias biologicamente ativas que envolvem desde ensaios químicos com substratos lipídicos a ensaios mais complexos com técnicas instrumentais. Esses testes têm se tornado ferramentas usuais e necessárias na seleção inicial de substâncias que possam ser aplicadas como fármacos, auxiliando os pesquisadores na avaliação da

atividade de substâncias isoladas de produtos naturais, bem como obtidas de fontes sintéticas. (SUCUPIRA et al., 2012).

Devido aos diferentes tipos de radicais livres e às suas diferentes formas de atuação nos organismos vivos, dificilmente existirá um método simples e universal pelo qual a atividade antioxidante possa ser medida precisa e quantitativamente. Para se ter uma avaliação mais precisa da atividade antioxidante de uma determinada substância, é necessário saber quais tipos de radicais são gerados, como, onde e a extensão do dano causado. Dessa forma, o entendimento sobre os efeitos dos compostos antioxidantes somente pode ser aperfeiçoado se metodologias mais específicas forem utilizadas, e se essas forem capazes de definir quais produtos são formados e inibidos pelos antioxidantes, e em quais condições, sistemas e alvos de proteção (ALVES et al., 2010; COTINGUIBA et al., 2013).

2.4.3.1 Método do sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH•)

O método químico do sequestro do radical DPPH• baseia-se na medida da capacidade antioxidante de uma determinada substância em sequestrar o radical DPPH•, reduzindo-o em hidrazina. É um dos métodos mais empregados, pois é considerado rápido, prático, com boa estabilidade na ausência de luz; além do fato de o radical DPPH• não precisar ser gerado e o sistema de reação envolver somente o radical e o antioxidante. A molécula de DPPH• é conhecida por caracterizar-se como um radical orgânico livre estável, de coloração violeta, com banda de absorção na faixa de 515-520 nm (COTINGUIBA et al., 2013; DENG; CHENG; YANG, 2011).

A estabilidade do radical DPPH• ocorre devido à sua estrutura química, que possui três anéis aromáticos, apresentando efeito de ressonância, importante para estabilizar a carga eletrônica do radical DPPH•. O deslocamento do elétron desemparelhado sobre o radical DPPH•, nos três grupos de NO₂ e nos dois átomos de nitrogênio também conferem estabilidade à molécula (OLIVEIRA, 2015).

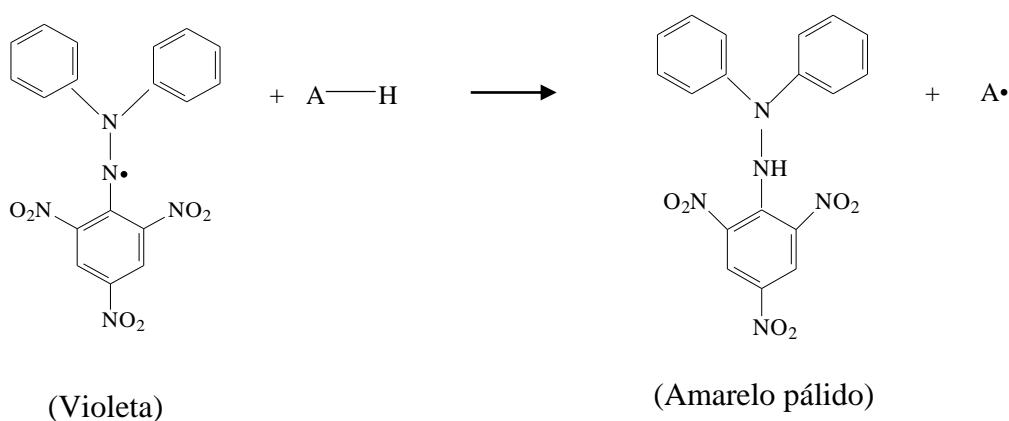
A redução do radical DPPH• é monitorada pelo decréscimo da absorbância durante a reação. Quando uma determinada substância atua como um antioxidante, doando próton ou elétron, é adicionada a uma solução de DPPH•, a hidrazina é obtida com mudança simultânea na coloração de violeta a amarelo pálido (COTINGUIBA et al., 2013).

A mudança de coloração é resultante da diminuição da absorbância do radical DPPH• e pode ser monitorada por um espectrofotômetro UV/visível para a determinação da capacidade antioxidante. Esse monitoramento tem que ser realizado sempre no escuro, uma

vez que a luz é um fator que interfere diretamente na reação do radical DPPH• com uma substância, acelerando a diminuição da absorbância e, conseqüentemente alterando os resultados finais (OLIVEIRA, 2015).

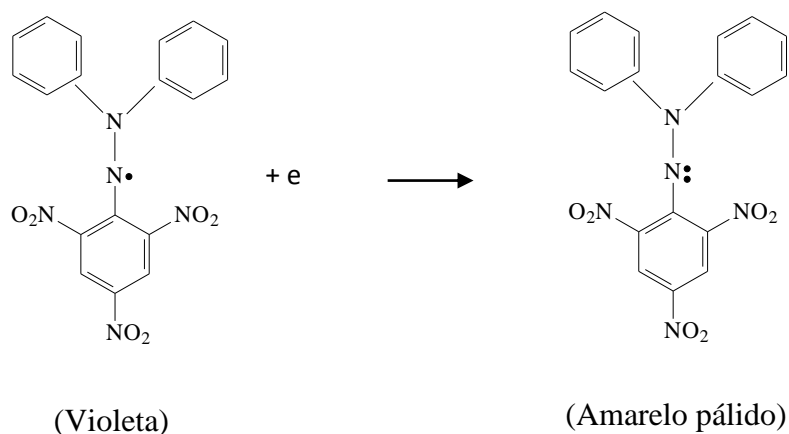
Existem dois tipos de mecanismos de reação que ocorrem na determinação da capacidade antioxidante empregando-se o método de captura do radical DPPH•, ambos são resultantes da neutralização ou redução de um radical. Um desses mecanismos baseia-se na transferência de elétrons e o outro na transferência de um átomo de hidrogênio. Os mecanismos de transferência de hidrogênio e elétrons para o radical DPPH• estão representados nas Figuras 7 e 8, respectivamente (OLIVEIRA, 2015).

Figura 7- Mecanismo de reação entre o radical DPPH• e um antioxidante mediante a transferência de um átomo de hidrogênio.



Fonte: Adaptado de Oliveira (2015).

Figura 8- Mecanismo de reação entre o radical DPPH• e um antioxidante mediante a transferência de um elétron.



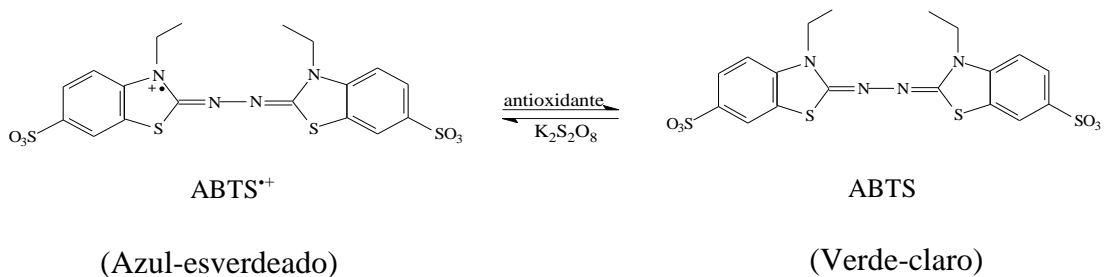
Fonte: Adaptado de Oliveira (2015).

2.4.3.2 ABTS

O ensaio ABTS baseia-se na geração do radical catiônico 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) (ABTS^{•+}) de coloração azul-esverdeado por meio da reação entre o ABTS e o persulfato de potássio (K₂S₂O₈) ou dióxido de manganês (MnO₂). O radical ABTS^{•+} pode ser reduzido por antioxidantes presentes na amostra por transferência de elétrons ou átomos de hidrogênio e, então, é desativado, sendo convertido em uma forma não colorida ou verde mais claro (Figura 9). Além disso, os antioxidantes podem reagir com os radicais e formar vários produtos derivados da adição ou degradação do ABTS^{•+} (CHRISTODOULEAS et al., 2015; LÓPEZ-ALARCON; DENICOLA, 2013).

A diminuição da absorbância desse radical é determinada em função das variáveis concentração e tempo e pode ser medida por espectrofotometria a 734 nm e monitorada por um antioxidante padrão, como o BHT, Trolox ou ácido ascórbico. Quando os resultados são expressos em equivalentes de Trolox, o teste é denominado TEAC (Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox), expresso como unidades equivalentes de Trolox, que correspondem a 1,0 mM da substância analisada (COTINGUIBA et al., 2013; MAGALHÃES et al., 2008).

Figura 9 - Estabilização do radical ABTS^{•+} por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.



Fonte: Adaptada de Borges et al. (2011)

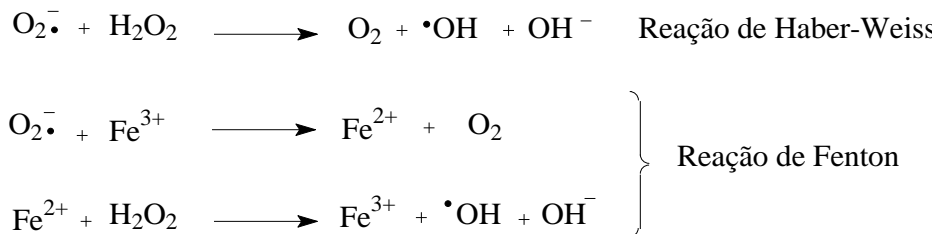
2.4.3.3 Radical hidroxil

O radical hidroxil é uma das espécies reativas ao oxigênio com maior potencial de oxidação que afetam o sistema biológico e reagem com ácidos graxos poli-insaturados, causando danos à célula. Esses radicais abstraem átomos de hidrogênio dos lipídios e, após reagirem com o oxigênio, dão origem aos radicais peroxil e iniciam a peroxidação lipídica. Podem ser gerados através da reação do H₂O₂ com metais de transição ou pela homólise da água por exposição à radiação ionizante. Além disso, possuem tempo de meia-vida muito

curto ($\sim 10^{-9}$ s) e dificilmente podem ser sequestrados *in vivo* (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013; BRIZZOLARI et al., 2017).

Existem diversos testes para avaliar a habilidade de captar os radicais hidroxilas, mas um dos métodos específicos é o ensaio empregando-se a 2-desoxirribose. A principal fonte de radicais hidroxila *in vivo* é provavelmente a chamada reação de Haber-Weiss, em que o radical $O_2^{\bullet-}$ reduz Fe^{3+} a Fe^{2+} e, dessa forma, inicia a reação de Fenton entre Fe^{2+} e H_2O_2 , conforme descrito na Figura 10. O radical formado pode, então, reagir com 2-desoxirribose para formar produtos que, sob aquecimento com ácido tiobarbitúrico (TBA) em pH baixo, apresentam coloração rosada, sendo monitorado por espectrofotometria na região do visível a 532 nm (ALVES et al., 2010; ÖZYÜREK et al., 2008).

Figura 10 - Reações de Haber-Weiss e de Fenton para formação do radical hidroxil.



Fonte: Özyürek et al. (2008).

2.4.3.4 Sistema β -caroteno/ácido linoleico

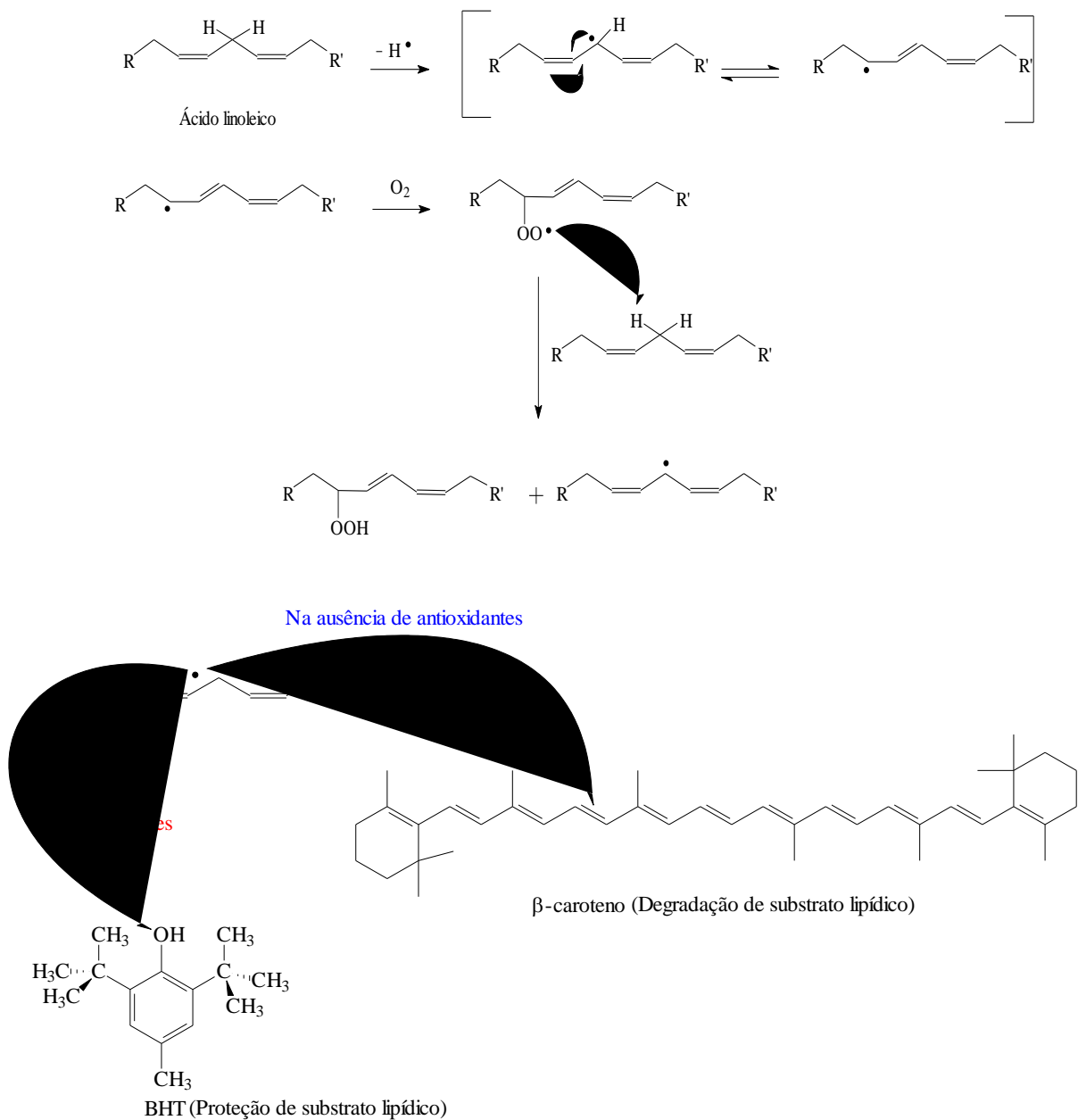
Esse tipo de avaliação da atividade antioxidante é realizado em meio emulsionado, pela técnica de cooxidação de substratos. O método fundamenta-se no princípio de que o ácido linoleico, um ácido graxo insaturado, oxida-se pelas espécies reativas ao oxigênio presentes na água oxigenada. Dessa forma, esse teste antioxidante permite analisar a capacidade que uma determinada substância possui para impedir a oxidação do β -caroteno, protegendo-o dos radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013).

O Tween-20 é empregado como emulsificante e ajuda a dissolver completamente a mistura β -caroteno/ácido linoleico em clorofórmio que, após total remoção do solvente, é dissolvida em água previamente saturada com oxigênio atmosférico. O resultado pode ser comparado com padrões sintéticos, como BHA, BHT e Trolox, ou naturais, como ácido gálico ou quercetina (ALVES et al., 2010).

É um método colorimétrico, realizado em comprimento de onda de 470 nm, baseado na oxidação (descoloração) do β -caroteno, provocada pelos produtos da degradação oxidativa

do ácido linoleico. A descoloração ocorre em função do radical peroxil ($\text{ROO}\cdot$), agente oxidante, formado na oxidação do ácido linoleico, que reage com as duplas ligações do β -caroteno, perdendo seu cromóforo, resultando na descoloração do pigmento alaranjado, característico da solução (Figura 11). A presença de antioxidantes no sistema protege o ácido linoleico, prolongando o período de formação dos radicais e retardando o decaimento da absorvância do β -caroteno (SUCUPIRA et al., 2012).

Figura 11- Reação de oxidação do sistema β -caroteno/ ácido linoleico.



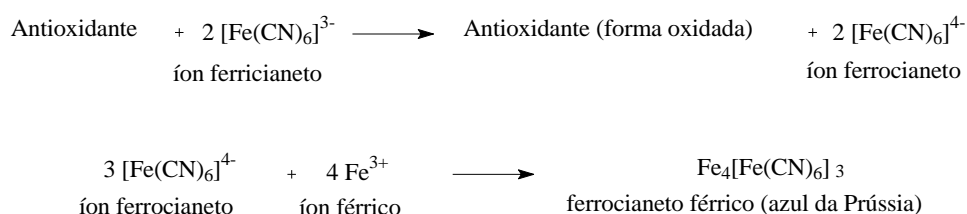
Fonte: Adaptado de Teixeira (2016).

2.4.3.5 Poder antioxidante de redução do ferro

Esse ensaio baseia-se na capacidade em que substâncias antioxidantes possuem em reduzir íons ferricianeto a ferrocianeto em meio ácido. É um método baseado em reações de transferência de elétrons e indica a habilidade de um potencial antioxidante transferir um elétron, a fim de reduzir radicais, metais ou carbonilas, o qual usa como indicativo a mudança de cor do oxidante (SANTOS et al., 2007).

Assim, na presença do íon férrico (proveniente do FeCl_3), ocorre a formação de um complexo de coloração azul da Prússia, com máximo de absorção em 700 nm, determinando o poder redutor da amostra e conseqüentemente seu potencial antioxidante (Figura 12). Dessa forma, à medida que se aumenta a capacidade dos compostos em doar elétrons para que a reação de redução ocorra, a solução torna-se mais escura e, portanto, o aumento da absorbância revela maior capacidade de redução da amostra (SILVA et al., 2011a; SUCUPIRA et al., 2012).

Figura 12- Reações de redução do ferricianeto a ferrocianeto.



Fonte: Adaptado de Santos et al. (2007).

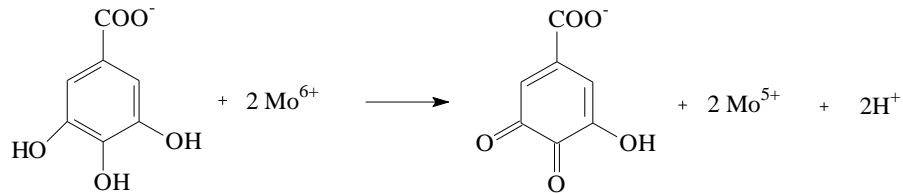
2.4.3.6 Redução do molibdênio

Este método para a determinação quantitativa da capacidade antioxidante fundamenta-se na formação do complexo fosfomolibdato. O teste é baseado na redução do Mo (VI) a Mo (V) pela presença de uma substância antioxidante e subsequente formação de um complexo de fosfato de Mo (V) de coloração verde em pH ácido, com absorção máxima em 695 nm (Figura 13) (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013).

A solução teste inicial apresenta coloração amarela, e conforme a solução de fosfato molibdênio se reduz por meio da doação de elétrons por parte do composto antioxidante, essa torna-se verde e, quanto mais intensa for a coloração, maior o potencial antioxidante da amostra. Além do mais, esse método possui a vantagem de avaliar a capacidade antioxidante

tanto de componentes lipofílicos quanto de hidrofílicos (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999).

Figura 13- Reação de redução do molibdênio empregando o ácido gálico como agente oxidante.



Fonte: Do autor (2018).

2.5 Câncer

Nos dias atuais, o câncer é uma das doenças mais alarmantes em todo o mundo e pode ser descrito como um conjunto de processos complexos que causam proliferação descontrolada das células, bem como alterações na fisiologia celular. O desenvolvimento desses processos frequentemente induzem à formação de tumores malignos e resultam na invasão de tecidos distantes para formar metástases (GEORGE; DELLAIRE; RUPASINGHE, 2017).

Conforme estimativas da GLOBOCAN (2012), cerca de 14,1 milhões de novos casos de câncer e 8,2 milhões de mortes ocorreram no ano de 2012. Além disso, há muitos casos diagnosticados já em estágios avançados, quando as opções de tratamento são apenas paliativas. O aumento acentuado no número de casos de câncer pode ser atribuído à mudanças nos hábitos alimentares, uso de cigarro e álcool, infecções crônicas, exposição a radiações nocivas e químicas, assim como mudanças no estilo de vida e poluição ambiental. Segundo Torre et al. (2015), a taxa de mortalidade entre pacientes com câncer é elevada e o problema é mais grave em países economicamente menos desenvolvidos, devido à falta de técnicas diagnósticas, métodos padrões de tratamento e alto custo do tratamento.

Dessa forma, muitos pesquisadores buscam solucionar esses problemas por meio do uso de drogas sintéticas, sendo designadas para atingir especificamente o crescimento rápido e a divisão celular de vários tumores. Entretanto, a natureza não discriminatória desses fármacos leva a efeitos colaterais graves em células normais, com alto índice proliferativo responsável pelo crescimento e regeneração. Conseqüentemente, em decorrência desses efeitos, perda de cabelo, infecções devido à destruição de glóbulos brancos, anemia provocada

pelo rompimento de glóbulos vermelhos e sangramento ocasionado pela destruição de plaquetas são comumente evidenciados na quimioterapia (LESGARDS et al., 2014).

Assim, o alto custo dos medicamentos, o aumento da resistência aos fármacos e os efeitos colaterais dos tratamentos terapêuticos direcionam os cientistas a explorarem medicamentos alternativos que possam auxiliar no tratamento do câncer. Com isso, busca-se fármacos que sejam altamente eficazes, com baixa toxicidade e impacto ambiental, sendo crescente a procura por novos produtos naturais que ofereçam oportunidades para inovação na descoberta de novos medicamentos (GAUTAM; MANTHA; MITTAL, 2014).

2.5.1 Produtos naturais como agentes antitumorais

Os produtos naturais desempenham uma função importante tanto na prevenção quanto no tratamento do câncer, uma vez que um número considerável de agentes antitumorais usados atualmente na medicina são de origem natural. Ressalta-se que mais da metade dos medicamentos anticâncer prescritos internacionalmente são oriundos dos produtos naturais e seus derivados, visto que atuam como uma fonte indispensável de diversidade molecular e mecanicista para a descoberta de novos fármacos (XIAO; MORRIS-NATSCHKE; LEE, 2016).

As plantas são uma fonte importante para a descoberta de novos protótipos com potencial farmacológico, uma vez que possuem um amplo espectro de metabólitos secundários bioativos. Estima-se que mais de 5000 fitoquímicos isolados foram identificados em frutos, vegetais, grãos e outras plantas, classificados principalmente como fenólicos, carotenoides, vitaminas, alcaloides, compostos contendo nitrogênio, organossulfurados e óleos essenciais. Dentre a ampla diversidade estrutural de fitoquímicos, os componentes dos óleos essenciais têm despertado interesse e maior atenção para a diversa variedade de bioatividades e constituem uma fonte particularmente interessante de potenciais compostos anticancerígenos (BHALLA; GUPTA; JAITAK, 2013; NEWMAN; CRAGG, 2016).

Os óleos essenciais apresentam uma ampla variedade de estruturas químicas e, por meio de técnicas cromatográficas de alta resolução, sua composição química pode ser elucidada, facilitando a identificação de seus constituintes ativos. Devido à sua composição heterogênea, é difícil definir um único mecanismo de ação para os OE's. Na verdade, uma molécula pode apresentar efeito em um tipo de tumor e não mostrar efeito algum em outros tipos. Isso vem de encontro com o estudo de Murata et al. (2013), que relatam que o 1,8-cineol induz apoptose em células de câncer de cólon humano, porém essa mesma molécula

não exibe efeito algum sobre o câncer de próstata e células de glioblastoma. Dependendo do enriquecimento dos compostos ativos, muitos mecanismos podem ser observados, como efeito no ciclo celular, crescimento celular ou apoptose (BAYALA et al., 2014).

O ciclo celular possui função relevante em relação aos processos carcinogênicos. É entendido como uma sequência de eventos que permite o crescimento e a replicação das células. A progressão desses eventos é governada por fatores externos e internos, com pontos de controle que regulam a complexa rede de interações no decorrer do ciclo. Os defeitos em relação aos pontos de checagem podem levar a um acúmulo de anormalidades de DNA e transtornos patológicos subsequentes. Grande parte dos fármacos antineoplásicos atuam em uma das fases do ciclo celular; portanto, a compreensão do funcionamento e regulação desse processo é fundamental para a elucidação dos mecanismos de ação dessas substâncias (ALMEIDA et al., 2005; FOSTER, 2008).

Um estudo realizado por Edris (2007) indica que os componentes dos óleos essenciais, especialmente os monoterpenos, têm múltiplos efeitos farmacológicos sobre o metabolismo do mevalonato, que podem explicar a atividade supressora do tumor. O autor verificou que os monoterpenos exercem funções quimiopreventivas e quimioterapêuticas em modelos de tumor mamário, e, portanto, podem representar uma nova classe de agentes terapêuticos. O termo quimioprevenção está relacionado aos avanços na compreensão do processo carcinogênico em nível celular e molecular realizado nas últimas décadas, levando a uma nova abordagem promissora para a prevenção do câncer. A quimioprevenção visa a interromper ou reverter o desenvolvimento e a progressão de células pré-cancerosas por meio do uso de compostos não citotóxicos, no período compreendido entre a iniciação do tumor e a malignidade. A quimioterapia, por sua vez, atua na fase de promoção, em que a inibição da proliferação de células tumorais, bem como a aceleração da taxa de morte de células tumorais, podem ocorrer.

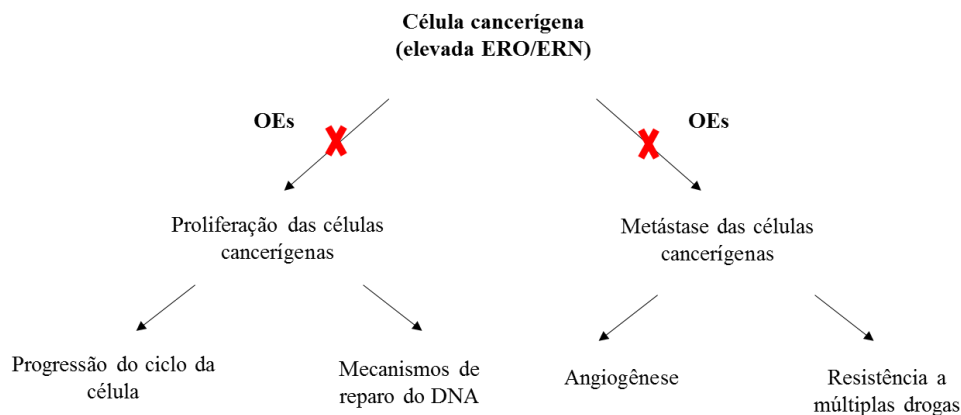
Gali-Muhtasib e Affara (2000) verificaram que o óleo essencial de *S. triloba*, quando aplicado topicamente à pele de ratos, retardava o aparecimento do tumor em quatro semanas e inibia a multiplicidade do tumor em cerca de 78%, além de reduzir o peso dos tumores em 80%. Posteriormente, Gali-Muhtasib (2006), a fim de determinar a natureza do agente responsável para o efeito antitumoral observado, avaliou a atividade antiproliferativa dos componentes individuais do óleo essencial de sálvia contra células cancerígenas humanas e de roedores. Para isso, os componentes do OE foram aplicados sozinhos (α -terpineol/acetato de linalila) ou em combinação (α -terpineol + acetato de linalila) e a atividade dos componentes foi verificada pela inibição da taxa de proliferação das células tumorais *in vitro*,

resultante da síntese de DNA inibida ou alterada, bloqueio do ciclo celular ou indução de apoptose. Além do mais, observou-se efeito sinérgico relevante após o tratamento com os compostos α -terpineol, acetato de linalil e cânfora. Por fim, Gali-Muhtasib (2006) considera que o isolamento de um composto ativo é a primeira etapa no desenvolvimento de um novo agente, que pode ser desenvolvido como uma droga para o avanço de ensaios clínicos e futuramente para uso comercial.

Moléculas derivadas de plantas como o taxol são eficazes contra a proliferação de células cancerígenas. Vários tipos de doenças malignas, como glioma, câncer de cólon, câncer gástrico, tumores hepático e pulmonar, câncer da mama e leucemia são relatados por serem reduzidos após o tratamento com óleos essenciais de plantas. Giaginis e Theocharis (2011) apontam que os compostos voláteis de *Pistacia lentiscus* L. (Chios mastic gum) têm sido associados com a inibição do câncer de cólon, próstata e pulmão *in vitro* (RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

A maioria das drogas empregadas no tratamento do câncer visam à indução de apoptose pela célula cancerígena e/ou o bloqueio do ciclo celular; assim, produtos naturais que induzam apoptose ou bloqueio em uma das fases do ciclo celular são recursos valiosos na supressão do câncer. São vários os mecanismos envolvendo o tratamento do câncer, tais como a ativação de enzimas de desintoxicação, modulação de reparo do DNA, antimetático e antiangiogênico. Múltiplas vias estão envolvidas na atividade antiproliferativa demonstrada pelos OEs em células cancerígenas, revelando que são eficazes na redução de tumores em modelos animais. As rotas para a prevenção de câncer pelos OEs estão representadas na Figura 14. Isso torna os OEs potenciais agentes antitumorais, já que nenhum grande efeito aparente é exibido nas células normais (GAUTAM; MANTHA; MITTAL, 2014).

Figura 14 - Possível rota para a morte de células cancerígenas mediada por óleos essenciais e seus constituintes.



Fonte: Adaptado de Gautam; Mantha; Mittal (2014).

Os OEs, bem como seus compostos isolados, são promissores na prevenção e tratamento do câncer, sendo largamente explorados nas preparações farmacêuticas. Além disso, são avaliados como agentes terapêuticos e podem ser empregados como complemento a terapias convencionais. Pesquisas com constituintes de OEs como agentes antitumorais estão em fase de crescimento em virtude do imenso potencial que esses apresentam.

2.6. Fungos toxigênicos em alimentos e produção de micotoxinas

Os fungos são organismos eucarióticos, unicelulares, multinucleados, de natureza heterotrófica e caracterizados por uma parede celular quitinosa. Na maioria dos casos, os fungos são formados por filamentos denominados hifas, que, em conjunto, formam o micélio, responsável por promover tanto a fixação do bolor no substrato como a reprodução por meio da produção de esporos. Cerca de 70.000 espécies de fungos foram relatadas e descritas, mas estima-se que aproximadamente 1,5 milhão de espécies ainda possam existir (HAWKSWORTH, 1991).

Os fungos patogênicos e toxigênicos tornaram-se um problema crítico em muitas áreas, como agricultura, saúde e segurança humana. Além disso, ressalta-se que o armazenamento dos alimentos sob condições inadequadas contribui para o crescimento desses micro-organismos (MAZIERO; BERSOT, 2010).

Algumas espécies que deterioram alimentos pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* podem produzir micotoxinas tóxicas aos humanos e animais. Naturalmente presentes no ar ambiente, no solo e em diversas culturas, os fungos micotoxigênicos estão entre os contaminantes mais importantes nos alimentos em termos de impacto na saúde pública, segurança alimentar e economia de vários países. As micotoxinas são decorrentes do metabolismo secundário dos fungos e, portanto, não são diretamente essenciais para o crescimento normal desses micro-organismos e são compostos de baixo peso molecular. É importante ressaltar que ainda que o fungo seja inativado ou retirado durante o processamento e não esteja presente no produto manufaturado, as micotoxinas podem permanecer, uma vez que são dificilmente destruídas (HYMERY et al., 2014).

Esses metabólitos são comumente encontrados em diversos alimentos. Assim, podem se desenvolver em vários tipos de substratos, como em cereais, carnes, nozes, queijos, uvas, grãos de café, maçãs e produtos derivados), relacionados às fases de produção no campo, armazenamento pós-colheita e influência de condições climáticas. Além disso, as micotoxinas

são conhecidas por serem resistentes ao processamento industrial de alimentos, visto que são termoestáveis, resistindo a tratamentos térmicos ou processos de desidratação que são suficientes para destruir o micélio vegetativo dos fungos que as produziram. Estabeleceu-se que os perfis de produção de micotoxinas podem mudar sob diferentes condições de crescimento, incluindo a composição do substrato, fatores ecofisiológicos, incluindo temperatura, pH, concentração de oxigênio e fatores bióticos, incluindo interações microbianas (HYMERY et al., 2014; RODRÍGUEZ et al., 2015).

Além disso, Bhat, Ray e Karin (2010) relataram que, de acordo com a Food and Agriculture Organization (FAO), em todo o mundo cerca de 25% da produção agrícola estão contaminados com micotoxinas e a perda estimada se estende a bilhões de dólares. Ademais, a situação é mais crítica nos países situados em zonas tropicais e subtropicais, devido às condições ambientais favoráveis para o desenvolvimento dos fungos e a produção de micotoxinas (PRAKASH et al., 2015).

De modo geral, os efeitos relacionados à contaminação por micotoxinas são lentos e contínuos, embora casos agudos possam ocorrer. Os sinais e sintomas vão desde lesões de pele, sintomas de hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, neurotoxicidade, hematotoxicidade e genototoxicidade, podendo induzir ao óbito. Podem apresentar ainda efeitos mutagênicos, teratogênicos, carcinogênicos ou imunossupressores (DOS SANTOS et al., 2014).

2.6.1 Óleos essenciais e seus constituintes como antifúngicos

As infecções fúngicas são um problema terapêutico em diversos locais, apesar da disponibilidade de vários tratamentos. Nos últimos anos, a crescente resistência dos microorganismos frente aos compostos antifúngicos, bem como efeitos indesejáveis provocados por esses compostos, tais como carcinogenicidade, teratogenicidade e toxicidade, induzem a indústria farmacêutica a encontrar novas soluções para o controle de doenças. Assim, com base nas dificuldades encontradas devido à resistência de cepas a fármacos e aos seus efeitos colaterais, as infecções fúngicas estão associadas a altas taxas de morbidade e mortalidade (MARKOVIĆ et al., 2016; SARDI et al., 2013).

Os fungos encontram-se amplamente distribuídos no meio ambiente, sendo contaminantes frequentes dos alimentos. Os alimentos e seus subprodutos são ricos em nutrientes, e quando associados a condições ambientais e características intrínsecas, são substratos propícios para o crescimento e desenvolvimento dos fungos. Uma vez situados no alimento, os fungos degradam os nutrientes e promovem alterações organolépticas

comprometedoras da qualidade nutricional e econômica desses produtos. No entanto, os fungos também podem promover alterações desejáveis, devido à capacidade de conferir aos alimentos características sensoriais próprias, como na fabricação de queijos e na fermentação de cervejas e vinhos (FILHO; CALDAS; MURATORI, 2015).

Os produtos naturais derivados das plantas são tradicionalmente empregados na etnomedicina e, dentre eles, destacam-se os óleos essenciais e o estudo de seus constituintes isolados. Muitas plantas contêm uma variedade de metabólitos secundários com extensa diversidade de estruturas químicas, além do fato de as características bioquímicas e fisiológicas destes metabólitos estarem fortemente correlacionadas com sua função. Estudos como os de Marković et al., (2016), Xiang et al., (2017) e Xie et al., (2017) evidenciam que os produtos naturais apresentam grande potencial para uso nas mais diversas áreas, como na indústria alimentar, cosmética, agrícola e farmacêutica.

Diversos fungos patogênicos vegetais e humanos, incluindo leveduras, são susceptíveis aos óleos essenciais e seus constituintes, de modo que a eficiência da inibição varia com o micro-organismo-alvo e o composto testado (ABBASZADEH et al., 2014; CAMARGO et al., 2017; GOMES et al., 2014; SANTIAGO et al., 2017).

2.6.2 Fungos do gênero *Aspergillus*

Aspergillus é um gênero de fungos filamentosos pertencente à classe Eurotiomycetes, filo Ascomycota e composto por mais de 250 espécies. Os fungos do gênero *Aspergillus* é um dos mais bem estudados, com uma distribuição mundial ocupando numerosos nichos, enquanto as espécies individuais de *Aspergillus* são medicamente, ecologicamente e economicamente relevantes (KOTTA-LOIZOU; COUTTS, 2017).

A espécie *Aspergillus carbonarius* é caracterizada por apresentar conídeos pretos e/ou marrom-escuros, paredes rugosas e estipes longas e largas. A ocratoxina A é a principal micotoxina relacionada às cepas pertencentes a essa espécie produzida principalmente em uvas usadas na fabricação de vinhos. Essa micotoxina é uma nefrotoxina potente, com propriedades imunossupressoras, teratogênicas e carcinogênicas, sendo classificada como possível agente cancerígeno aos seres humanos (PATERSON et al., 2017).

Os fungos pertencentes à espécie *Aspergillus flavus* podem se desenvolver em uma variedade de alimentos como em oleaginosas, grãos, cereais, frutas secas, entre outras, sob condições de temperatura e umidade favoráveis. A espécie *Aspergillus flavus* produz metabólitos secundários altamente tóxicos, como as aflatoxinas. As aflatoxinas são as

micotoxinas mais tóxicas e carcinogênicas, devido à sua hepatocarcinogenicidade e sua produção está relacionada a diferentes fatores ambientais no campo e/ou durante o armazenamento. A contaminação por aflatoxinas pode ser reduzida pelo manejo adequado das culturas e pelas condições de armazenamento; já a inativação pode ser realizada por métodos físicos, químicos e biológicos, com a finalidade de fornecer alimentos seguros para a humanidade (ABRAR et al., 2013).

A espécie *Aspergillus ochraceus* é caracterizada por fungos que apresentam estirpes de paredes rugosas, cabeças conidias biseriadas, com colônias de crescimento lento e coloração amarelo-ocre. *Aspergillus ochraceus* é um grande produtor de ocratoxina A, podendo ser isolado principalmente de grãos de café, mas também pode ser encontrado em arroz, trigo, aveia, cevada, vinho e cereais (VISAGIE et al., 2014).

Os fungos da espécie *Aspergillus niger* desempenham um papel importante na agricultura e na indústria alimentar, como agentes infecciosos e contaminantes dos alimentos respectivamente, juntamente com a medicina, como agente causador da aspergilose. Além disso, são empregados na indústria de fermentação para produzir enzimas e produtos químicos. Desde 1923, *Aspergillus niger* tem sido explorado comercialmente pela produção de ácido cítrico, principalmente para uso em produtos alimentares, cosméticos e preparações farmacêuticas. Entretanto, também está relacionado à produção de micotoxinas (ocratoxina A), especialmente na fase de pós-colheita de frutas frescas e secas e certos vegetais, nozes, feijões e cereais (KOTTA-LOIZOU; COUTTS, 2017; NIELSEN et al., 2009).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Química Orgânica - Óleos Essenciais, do Departamento de Química (DQI), no Laboratório de Micotoxinas e Micologia de Alimentos, do Departamento de Ciência dos Alimentos (DCA) da Universidade Federal de Lavras e no Laboratório de Biologia Animal Integrativa (LABAInt), da Universidade Federal de Alfenas.

3.1 Padrões de óleos essenciais

Os padrões sintéticos dos constituintes dos óleos essenciais empregados nas análises de atividade antioxidante e antitumoral foram: α -terpineno, 1,8-cineol, Citronelal, L-limoneno, L-borneol, Mirceno, *p*-anisaldeido, *p*-cimeno, Timol, α -pineno, α -bisabolol, Citral, Cânfora, α -tocoferol, Eugenol, Geraniol, L-mentol, Linalol, Precoceno, Trans-cariofileno, Trans-farnesol, Trans-anetol, α -terpineol, β -citronelol, β -pineno, Metileugenol, 4-alilanol, Carvacrol, obtidos pela Sigma Chemical, Fluka AG, Aldrich Chemical e Acros. A Figura 15 representa a estrutura química desses compostos.

Figura 15– Estruturas químicas dos constituintes de óleos essenciais. (Continua)

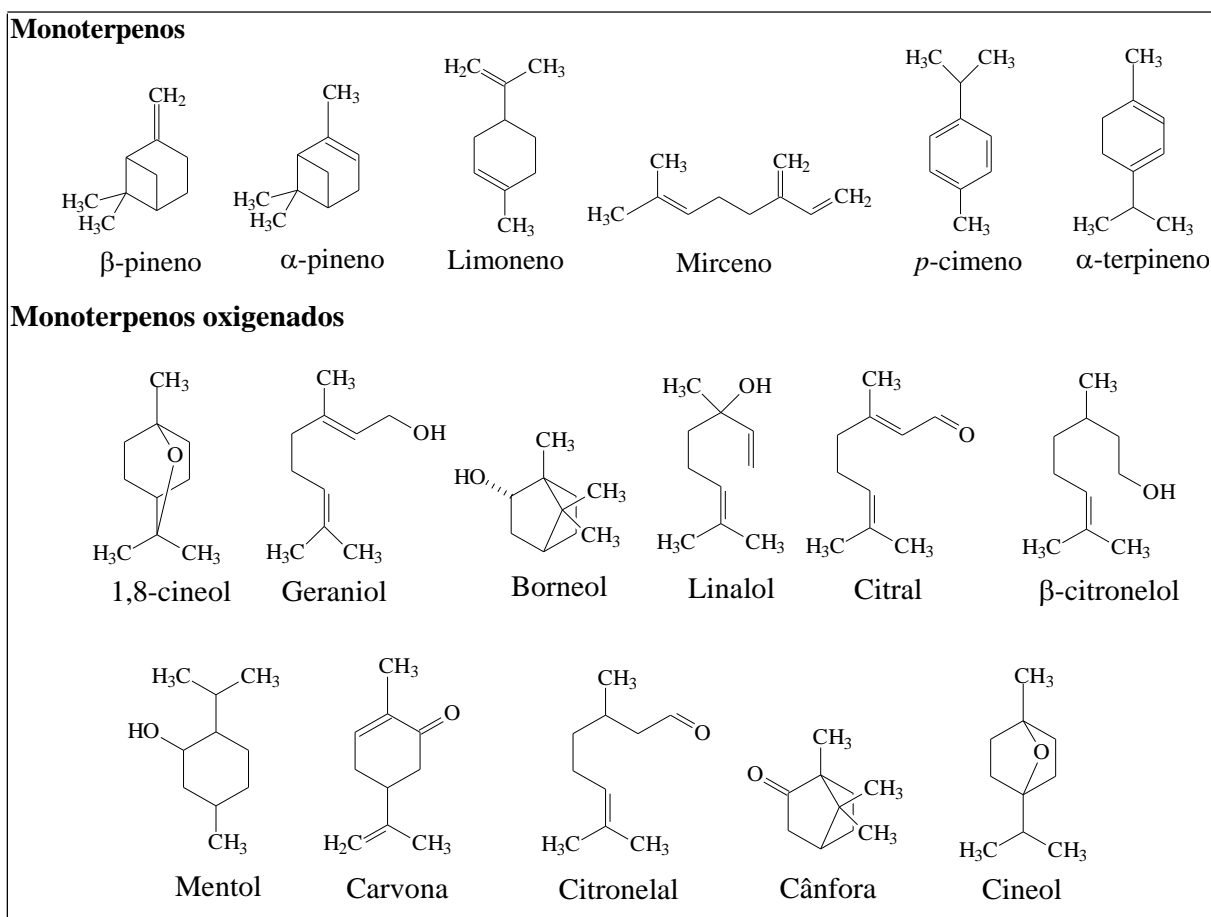
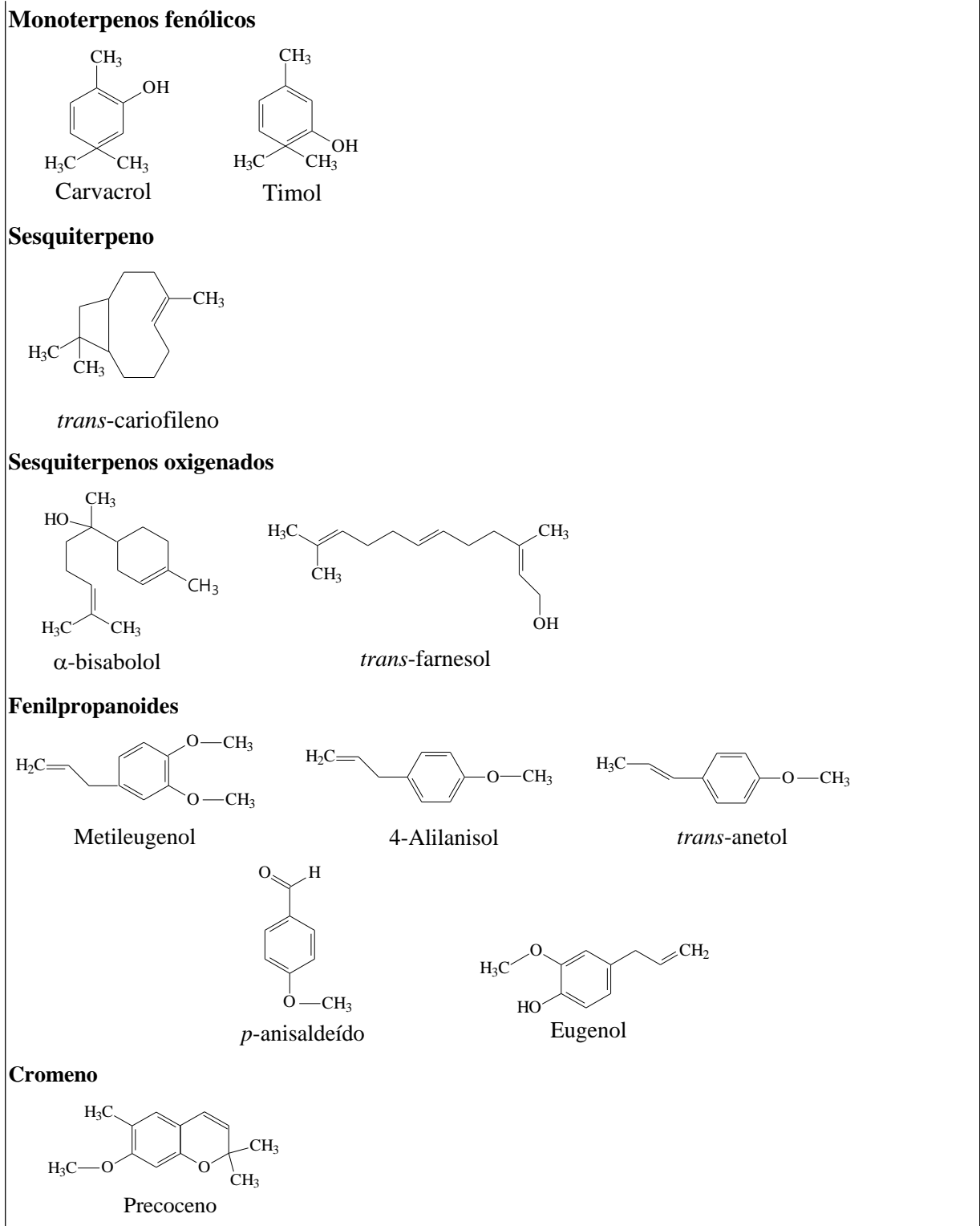


Figura 15 – Estruturas químicas dos constituintes de óleos essenciais. (Conclusão)



Fonte: Do autor (2018)

3.2 Atividade antioxidante

Os constituintes dos óleos essenciais e os controles positivos BHT (métodos DPPH, ABTS e β -caroteno/ácido linoleico), manitol (método Hidroxil) e ácido ascórbico (poder redutor do ferro e fosfomolibdato) foram avaliados nas concentrações de 25, 50, 100, 150, 200, 250 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Todas as leituras foram realizadas em triplicata.

3.2.1 Método do sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH•)

A avaliação da atividade antioxidante por meio do método do sequestro dos radicais livres 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH•) foi realizada com base nas metodologias empregadas por Lopes-Lutz et al. (2008) e Guimarães et al. (2011). Preparou-se uma solução etanólica de DPPH, na concentração de 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e foram adicionados em tubos de ensaio 2,7 mL dessa solução de DPPH, seguidos da adição de 0,3 mL dos compostos diluídos em etanol. Logo após, os tubos foram acondicionados ao abrigo de luz por um período de 60 minutos e realizaram-se as leituras em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 515 nm. A porcentagem de atividade antioxidante foi calculada, segundo a Equação 1:

$$AA\% = [1 - (A_{\text{amostra}}/A_{\text{controle}})] * 100 \quad \text{Equação (1)}$$

Em que:

A_{amostra} = Absorbância da amostra;

A_{controle} = Absorbância do controle negativo.

3.2.2 ABTS

A atividade antioxidante pelo método ABTS^{•+} [2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)] foi realizada de acordo com a metodologia empregada por Rezende et al. (2017). O radical ABTS^{•+}, formado pela reação da solução ABTS com persulfato de potássio 2,45 mM, foi incubado à temperatura de 25°C por cerca de 12 a 16h ao abrigo de luz. Após esse período, conferiu-se o valor de absorbância da solução preparada, a fim de que ela esteja entre 0,7 – 0,72, quando lida a 734 nm; caso contrário, deverá fazer uma diluição em etanol. Para o teste, foram transferidos 1900 μL do radical ABTS^{•+} para tubos de ensaio, seguidos da adição de 100 μL das amostras diluídas em etanol.

A porcentagem de inibição do radical ABTS^{•+} pelas amostras foi calculada conforme a Equação 2:

$$\% \text{ Efeito de captação do radical} = [(A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}) / A_{\text{controle}}] * 100 \quad \text{Equação (2)}$$

Em que:

A_{controle} = Absorbância do controle negativo;

A_{amostra} = Absorbância da amostra.

3.2.3 Radical hidroxil

O ensaio de atividade captadora do radical hidroxil foi conduzido conforme relatado por Boulanouar et al. (2013). A priori, preparou-se uma mistura contendo 10 mM de $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ e 10 mM de EDTA para a formação do complexo $[\text{FeSO}_4\text{-EDTA}]$. Em tubos de ensaio, foram adicionados 100 μL das amostras diluídas em água, 100 μL do complexo $[\text{FeSO}_4\text{-EDTA}]$ formado, 100 μL de 2-desoxirribose 10 mM, 700 μL de tampão fosfato 0,1 M (pH=7,4) e 100 μL de H_2O_2 . Em seguida, os tubos foram agitados e levados ao banho-maria a 50 °C por 60 minutos. Posteriormente, foram adicionados 500 μL de ácido tricloroacético (TCA) e 500 μL de ácido tiobarbitúrico (TBA). Após a adição desses últimos, os tubos foram incubados a 95 °C por 10 minutos e depois do resfriamento dos mesmos, efetuou-se a leitura em espectrofotômetro a 532 nm, sendo a atividade de inibição do radical $\text{OH}\cdot$ determinada com base na Equação 3.

$$\% \text{ Inibição} = (A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}/A_{\text{controle}}) * 100 \quad \text{Equação (3)}$$

Em que:

A_{controle} = Absorbância do controle negativo;

A_{amostra} = Absorbância das amostras.

3.2.4 Sistema β -caroteno/ácido linoleico

A avaliação da atividade antioxidante pela metodologia da inibição da oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico foi realizada conforme a metodologia de Kulisic et al. (2004), com modificações. Em um balão de fundo redondo, foram adicionados 20 mg de ácido linoleico, 100 mg de Tween 20 e 0,3 mg de β -caroteno, todos dissolvidos em clorofórmio. Em seguida, o clorofórmio foi retirado por meio de um rotaevaporador a 50 °C durante 1 hora. Após total remoção do clorofórmio, o resíduo foi dissolvido em 50 mL de água destilada oxigenada, sob agitação constante por cerca de 30 minutos. Posteriormente, foram adicionados em tubos de ensaio 2,5 mL dessa solução, seguidos da adição de 0,1 mL da diluição das amostras em etanol. Os tubos foram incubados a 50 °C em banho-maria por 60

minutos, para que a reação de oxidação ocorresse e, logo após, realizou-se a leitura da absorbância em um espectrofotômetro a 470 nm. A porcentagem de atividade antioxidante (AA%) foi calculada utilizando-se a Equação 4.

$$AA \% = [1 - (A_{T0} - A_{T60}/A_{CN0} - A_{CN60})] * 100 \quad \text{Equação (4)}$$

Em que:

A_{T0} = Absorbância no início da incubação com a amostra;

A_{T60} = Absorbância após 60 minutos da incubação com a amostra;

A_{CN0} = Absorbância no início da incubação com etanol;

A_{CN60} = Absorbância após 60 minutos de incubação com etanol.

3.2.5 Poder antioxidante de redução do ferro (FRAP)

A determinação do poder de redução das amostras foi realizada segundo metodologia descrita por Santos et al. (2007). Uma alíquota de 50 μ L das amostras diluídas em etanol foi transferida para tubos de ensaio, juntamente com 500 μ L de tampão fosfato (pH = 7,4) e 500 μ L de hexacianoferrato (III) de potássio 1%, diluído em água destilada. Os tubos foram agitados e levados ao banho-maria a 50 °C por 20 minutos. Em seguida, foram adicionados 500 μ L de ácido tricloroacético 10%, 1500 μ L de água destilada e 300 μ L de $FeCl_3$ 0,1%. A leitura da absorbância foi realizada no comprimento de onda de 700 nm. A capacidade antioxidante foi expressa com relação à inclinação da reta do ácido ascórbico.

3.2.6 Redução do molibdênio

A capacidade antioxidante pelo método de redução do molibdênio foi determinada pela metodologia descrita por Prieto; Pineda; Aguilar (1999). Inicialmente, 100 μ L das diluições em etanol das amostras foram adicionados em tubos de ensaio, seguidos de 2000 μ L da solução do complexo de fosfomolibdato de amônio. Esse complexo foi formado por ácido sulfúrico 10%, fosfato de sódio 28 mM e molibdato de amônio 4 mM. Os tubos foram incubados em banho-maria a 95°C por 60 minutos. Após o resfriamento dos tubos, realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 695 nm e os resultados foram expressos de acordo com a inclinação da reta do ácido ascórbico.

3.2.7 Avaliação dos dados

Os dados foram apresentados no formato de gráfico para análise visual de tendências e para comparação dos diferentes métodos. A verificação se o valor de atividade antioxidante (%AA) dos compostos aumenta com o aumento das concentrações foi feito com uso de regressão linear univariada (modelo linear). O programa estatístico utilizado foi o R (R Core Team, 2015).

3.3 Atividade antitumoral *in vitro*

3.3.1 Linhagens celulares e esquema de tratamento

Os testes foram realizados em três linhagens celulares derivadas de tumores humanos: adenocarcinoma de mama (MCF-7), melanoma (HT144) e adenocarcinoma de pulmão (A549). As culturas de células foram mantidas em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma, CA, USA) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Vitrocell, Campinas, Brasil). As células foram cultivadas em uma incubadora umidificada a 37 °C, contendo 5% de CO₂. Os compostos foram solubilizados em DMSO para a obtenção de uma solução estoque com concentração de 100 mg mL⁻¹, armazenada sob refrigeração até o momento de uso.

3.3.2 Análise da viabilidade celular

As células tumorais foram semeadas em placas de 96 poços. Após aderência por um período de 24 horas, as células foram tratadas por 48 horas com os constituintes de óleos essenciais na concentração de 100 µg mL⁻¹, para a observação de seu perfil de atividade sobre as diferentes linhagens celulares (triagem). Em seguida, curvas dose-resposta foram realizadas empregando-se as diferentes concentrações das amostras (18,75, 37,5, 75, 150 e 300 µg mL⁻¹) (FERREIRA-SILVA et al., 2017).

A viabilidade celular foi medida pelo ensaio colorimétrico com o corante resazurina (7-hidróxido-10-óxidofenoxazina-10-íon-3-ona). Esse composto atua como um indicador de oxirredução, uma vez que a resazurina de coloração azul e não fluorescente é reduzida à resorufina, de cor rosa e fluorescente. Esse processo é realizado por enzimas mitocondriais e a mudança de coloração do meio reflete diretamente a atividade celular, podendo ser medida em termos de absorvância, em comprimentos de onda de 570 e 600 nm. A taxa de células viáveis é diretamente proporcional à quantidade de resorufina produzida pelas enzimas desidrogenases (RAMPERSAD, 2012).

Assim, determinou-se a viabilidade celular, comparando-se os valores de absorvância entre as amostras tratadas com os valores de absorvância obtidos nas amostras-controles, conforme a Equação 5. Os experimentos foram conduzidos em triplicata e os dados apresentados como média \pm desvio-padrão (FERREIRA-SILVA et al., 2017). Os valores de IC₅₀ foram obtidos a partir de curvas de regressão usando o Software GraphPad®. A cisplatina, uma droga altamente citotóxica, utilizada em quimioterapia, foi utilizada como controle positivo.

$$\% \text{ Viabilidade celular} = (A_{\text{amostra}} * 100) / A_{\text{controle}} \quad \text{Equação (5)}$$

3.3.3 Quantificação do DNA para análise da progressão do ciclo celular

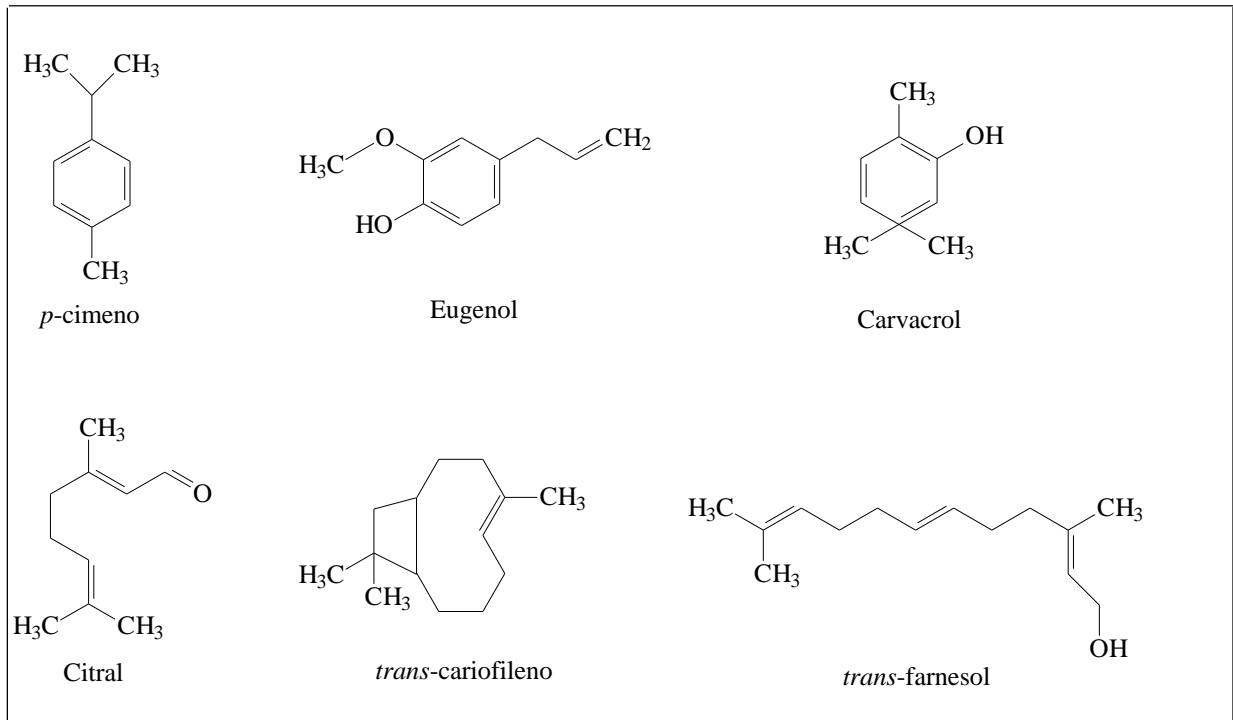
As células foram semeadas em placas de 35 mm e, após tratamento por 48 horas, as células foram coletadas por digestão enzimática (Trypsin-EDTA solution/Sigma Aldrich LTDA, Brasil) e transferidas para tubos Falcon. O precipitado de células foi obtido por centrifugação (5 minutos a 1000 rpm) e, na sequência, as células foram fixadas com etanol gelado (75% em PBSA-Salina fosfato tamponada) por 30 minutos. Após nova centrifugação, as células foram coradas por 1 hora em uma solução contendo PBSA, RNase (10 mg mL⁻¹) e Iodeto de Propídio (30 mg mL⁻¹) (Guava Technologies-Merck Millipore). As amostras foram analisadas no citômetro de fluxo (Guava Mini EasyCyte, 8HT) utilizando-se o software GuavaSoft 2.7.

3.4 Atividade antifúngica

Foram empregadas quatro espécies de fungos filamentosos: *Aspergillus carbonarius* (CCDCA 10507), *Aspergillus flavus* (CCDCA 10508), *Aspergillus ochraceus* (CCDCA 10506) e *Aspergillus niger* (CCDCA 10535). Todas as espécies foram adquiridas da Coleção de Cultura de Micro-organismos do DCA-UFLA.

Escolheu-se um constituinte de cada classe para analisar a atividade antifúngica sobre os fungos filamentosos. Os compostos escolhidos foram o *p*-cimeno, eugenol, carvacrol, citral, *trans*-cariofileno e *trans*-farnesol, obtidos pela Acros e Sigma Chemical, pertencentes às classes monoterpene, fenilpropanoide, monoterpene fenólico, monoterpene oxigenado, sesquiterpene e sesquiterpene oxigenado, respectivamente (Figura 16).

Figura 16 – Estrutura química dos compostos testados na atividade antifúngica.



Fonte: Do autor (2018).

3.4.1 Avaliação do efeito inibitório de constituintes de óleos essenciais sobre fungos do gênero *Aspergillus*

A análise do efeito inibitório dos constituintes de óleos essenciais sobre fungos filamentosos foi realizada utilizando-se o teste de difusão em disco aceito pelo Food and Drug Administration (FDA) e estabelecido pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (BRASIL, 2017). Para isso, utilizou-se um inóculo na concentração de 10^6 esporos mL^{-1} , com contagem em Câmara de Neubauer.

Após a contagem, transferiu-se o inóculo para a placa contendo meio de Agar Extract Malt (MEA), por meio da técnica de espalhamento em superfície. Foram adicionados discos de papel-filtro (5mm de diâmetro) sobre o meio de cultura e, em seguida, foram pipetados nos discos 10 μL dos padrões de óleos essenciais diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) nas concentrações de 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81 e 3,90 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Empregou-se DMSO como controle relativo e o fungicida sintético fluodioxonil ($2\mu\text{L mL}^{-1}$) como padrão de comparação. As placas foram incubadas em BOD a 25 °C durante 72 horas e, logo após, foram realizadas medições diametralmente opostas dos halos de inibição formados (ANDRADE et al., 2015).

O teste foi realizado em triplicata e definiu-se a concentração mínima inibitória (CMI) como a menor concentração da amostra em que foi perceptível a presença do halo de inibição.

3.4.2 Efeito dos compostos sobre o crescimento micelial dos fungos

A análise do crescimento micelial dos fungos foi realizada de acordo com Singh et al. (2008), com modificações. Como realizado para a avaliação do efeito inibitório, utilizou-se um inóculo na concentração de 10^6 esporos mL^{-1} , com contagem em câmara de Newbauer. O plaqueamento foi realizado adicionando-se 20 mL de meio Czapeck Yeast Agar (CYA) com os compostos diluídos em DMSO já presentes nele e, em seguida, foram adicionados 10 μL da suspensão de esporos dos fungos *A. carbonarius* e *A. niger* no centro da placa.

Para fins de comparação, 10 μL da suspensão de esporos foram adicionados à placa contendo apenas o meio, sem a amostra. O experimento foi realizado em triplicata e as placas foram vedadas e incubadas a BOD a 15, 20 e 25 °C, no escuro por 10 dias, sendo realizadas medições diametralmente opostas dos halos formados no 10º dia.

3.4.2.1 Avaliação dos dados e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) com um esquema fatorial de 5 x 3 (concentrações x temperaturas), com três repetições. O programa estatístico utilizado foi o SISVAR (FERREIRA, 2011).

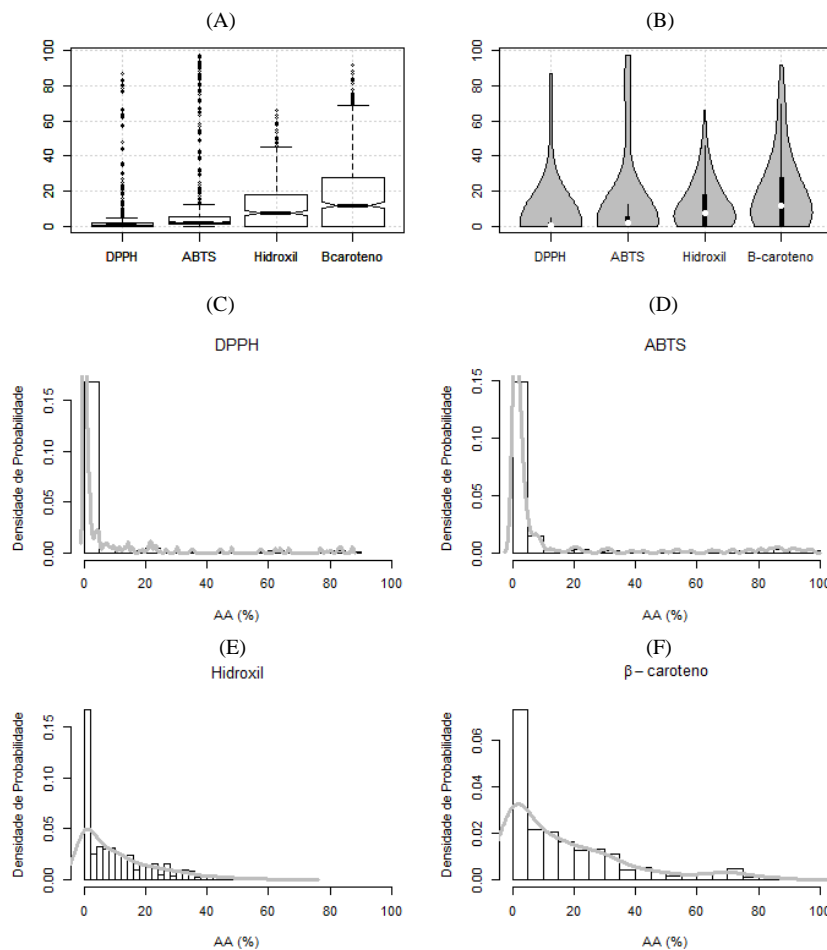
Os dados foram submetidos à análise de variância para a verificação dos tratamentos com os óleos essenciais sobre os resultados da redução do crescimento micelial e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Atividade antioxidante por diferentes metodologias

Os compostos presentes nos óleos essenciais foram analisados por diferentes metodologias antioxidantes. Os testes baseados na estabilização de radicais livres e na inibição da peroxidação lipídica foram analisados separadamente dos ensaios baseados na redução de íons metálicos, pois os valores da atividade antioxidante estão expressos em porcentagem de atividade (AA%), ao passo que nesses últimos as respostas estão expressas em valores de absorbância. A Figura 17 apresenta o perfil de resposta dos compostos analisados por meio dos ensaios DPPH, ABTS, Hidroxil, β -caroteno, independentes dos compostos e das concentrações, em que em (A) tem-se um gráfico do tipo boxplot; em (B) um gráfico do tipo violino; e em (C), (D), (E) e (F) histogramas.

Figura 17 – Distribuição das respostas em relação à resposta de atividade antioxidante (AA%) analisada por diferentes metodologias.



Fonte: Do autor (2018).

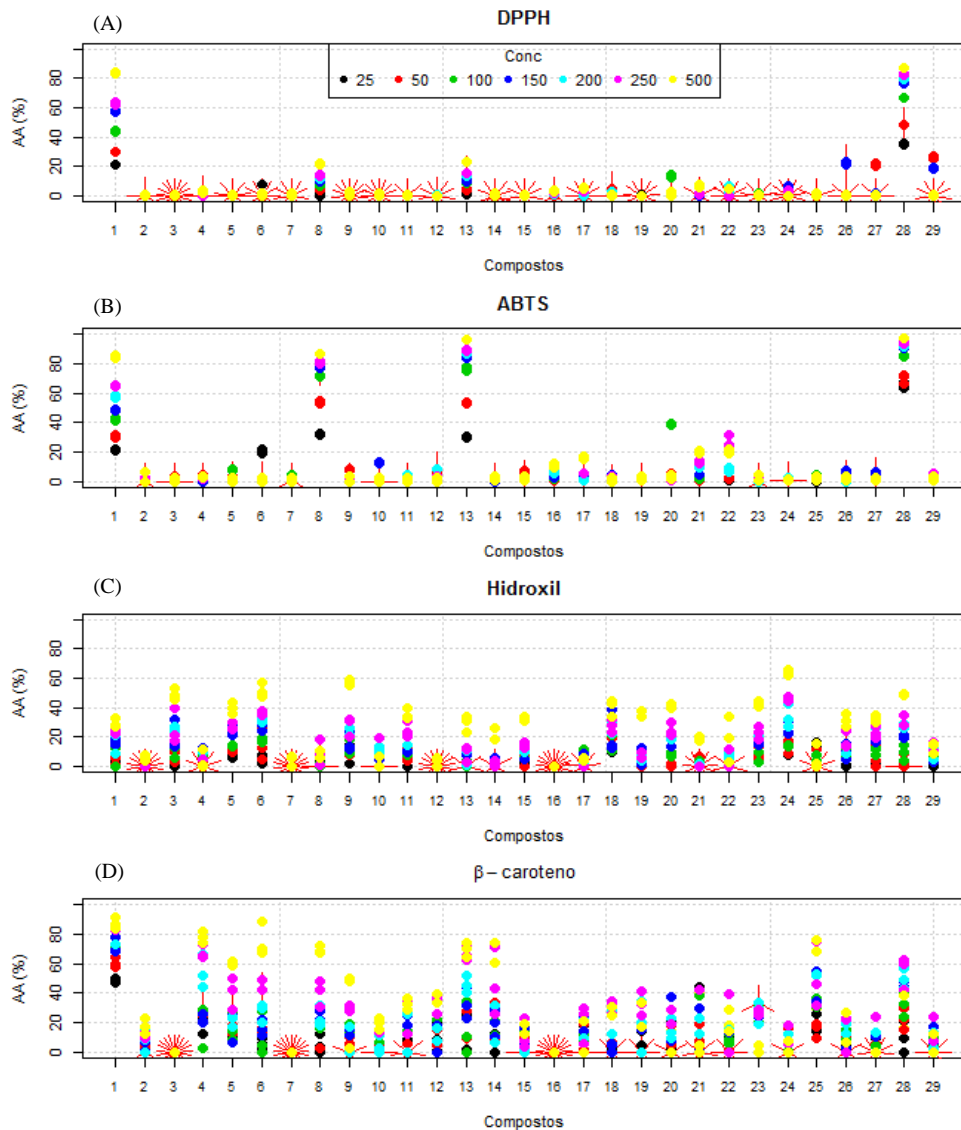
A subfigura (A) do tipo boxplot indica, por meio dos “boxes” (caixas), onde estão concentrados 50% dos compostos. Por conseguinte, os “whiskers” (tracinhos) representam 75%, o que permite observar a baixa atividade dos compostos nos testes DPPH e ABTS, visto que 75% dos compostos situam-se na região compreendida entre 0 e 20%. Os testes Hidroxil e β -caroteno obtiveram melhores resultados, uma vez que 75% compostos localizam-se na faixa de 40 a 70.

No gráfico do tipo violino (B), o formato da silhueta é uma estimativa da distribuição das respostas, tal como a linha cinza sobreposta nos histogramas. A silhueta mais larga na parte inferior representa onde se concentra a maior parte dos compostos, entre 0 e 20%.

Os histogramas (C), (D), (E) e (F) evidenciam as distribuições das respostas dos testes DPPH, ABTS, Hidroxil e β -caroteno de modo geral, independente dos compostos e de suas concentrações. Dessa forma, observa-se que os compostos apresentaram baixa atividade antioxidante, diante das metodologias empregadas. Assim, é possível analisar que a maior parte dos compostos concentram-se em valores de atividade antioxidante que variam de 0 a 20% e à medida que o gráfico tende a valores maiores de atividade, menos compostos evidenciam potencial antioxidante, conforme visto nos gráficos boxplot (A) e violino (B). Por meio da análise dos histogramas, também é possível evidenciar esse resultado, uma vez que os picos mais acentuados relacionados à densidade de probabilidade encontram-se nesse mesmo intervalo de atividade antioxidante.

Na Figura 18 exibem-se os dados, levando em consideração as concentrações empregadas no experimento, cujos valores são 25, 50, 100, 150, 200, 250 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, permitindo identificar os compostos juntamente com as concentrações em que apresentaram atividade. Nota-se que os gráficos (A), (B), (C) e (D) estão representados em um mesmo intervalo de atividade antioxidante (0-100%) e, assim, é possível comparar as informações apresentadas entre os gráficos.

Figura 18 – Atividade antioxidante dos compostos (%) por diferentes metodologias, juntamente com suas respectivas concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$).



Legenda: 1- Controle positivo; 2 – β -pineno; 3 – *trans*-cariofileno; 4 – Metileugenol; 5 – 1,8-cineol; 6 – Geraniol; 7 – α -pineno; 8 – Carvacrol; 9 – Borneol; 10 – α -bisabolol; 11 – Linalol; 12 – Limoneno; 13 – Timol; 14 – 4-Alilanisol; 15 – Citral; 16 – Mirceno; 17 – *p*-cimeno; 18 – β -citronelol; 19 – Mentol; 20 – Carvona; 21 – Citronelal; 22 – *trans*-anetol; 23 – Cânfora; 24 – Cineol; 25 – α -terpineol; 26 – Precoceno; 27 – *p*-anisalaldeído; 28 – Eugenol; 29 – *trans*-farnesol.

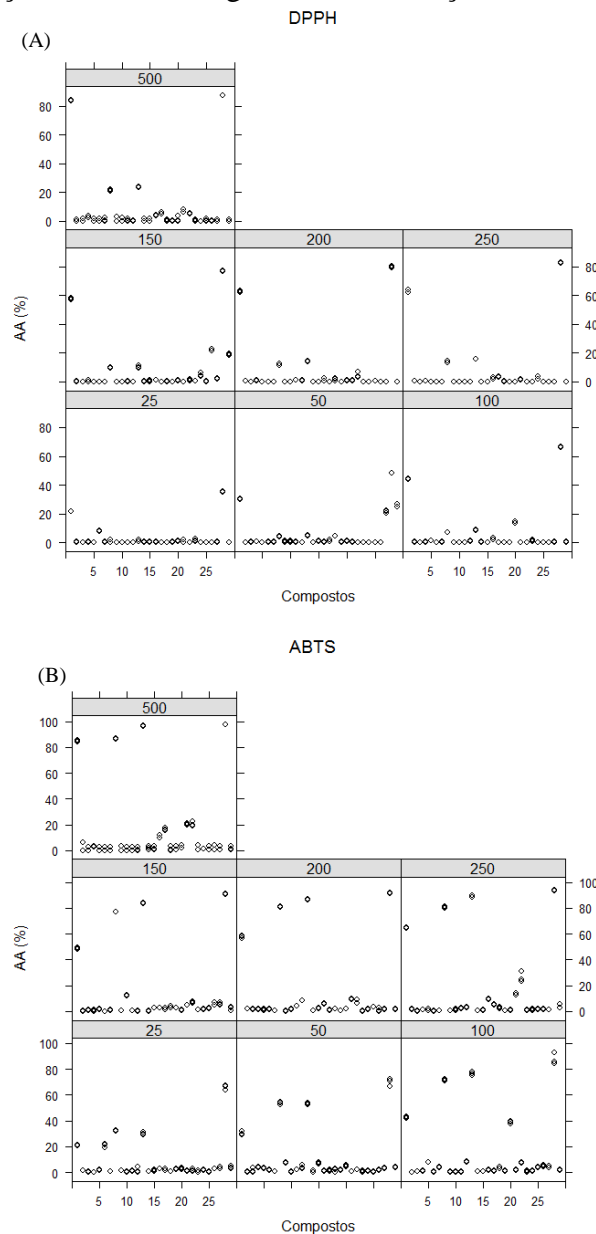
Fonte: Do autor (2018).

É possível estabelecer quais compostos possuem atividade antioxidante, quando se comparam os diferentes métodos, bem como em quais concentrações, relacionando-os com o controle. Diante das metodologias que envolvem a estabilização de radicais, é possível notar maior sensibilidade do ensaio ABTS, quando comparado com o método do sequestro de radicais DPPH, pois há maior número de compostos que se destacam por apresentar atividade

superior aos demais. Além disso, também é possível constatar melhor resposta dos compostos, quando avaliados pelas metodologias que envolvem a inibição da peroxidação lipídica.

Nas Figuras 19 e 20 apresentam-se gráficos de dispersão dos valores (eixo das ordenadas) em função dos 29 diferentes compostos (eixo das abscissas), separados por quadrados pela variável concentração, a fim de facilitar a análise visual dos dados.

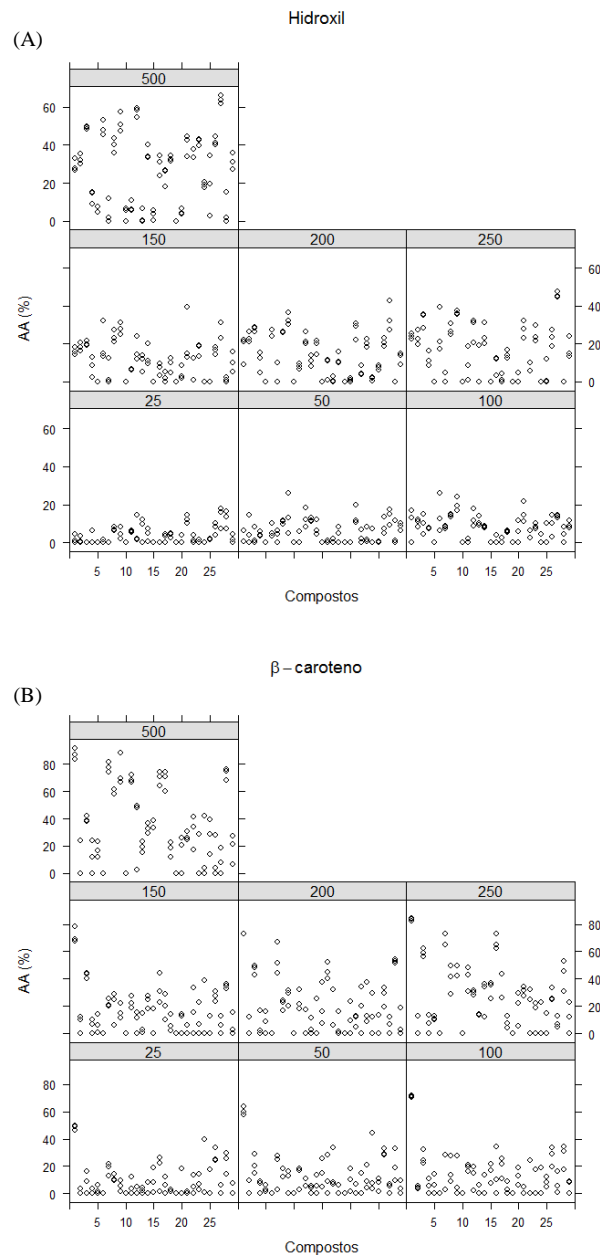
Figura 19 – Dispersão dos valores da atividade dos compostos separados pela variável concentração nas metodologias de estabilização de radicais.



Legenda: 1- Controle positivo; 2 – β -pineno; 3 – *trans*-cariofileno; 4 – Metileugenol; 5 – 1,8-cineol; 6 – Geraniol; 7 – α -pineno; 8 – Carvacrol; 9 – Borneol; 10 – α -bisabolol; 11 – Linalol; 12 – Limoneno; 13 – Timol; 14 – 4-Alilanisol; 15 – Citral; 16 – Mirceno; 17 – *p*-cimeno; 18 – β -citronelol; 19 – Mentol; 20 – Carvona; 21 – Citronelal; 22 – *trans*-anetol; 23 – Cânfora; 24 – Cineol; 25 – α -terpineol; 26 – Precoceno; 27 – *p*-anisalaldeído; 28 – Eugenol; 29 – *trans*-farnesol.

Fonte: Do autor (2018).

Figura 20 – Dispersão dos valores da atividade dos compostos separados pela variável concentração nas metodologias de inibição da peroxidação lipídica.



Legenda: 1- Controle positivo; 2 – β -pineno; 3 – *trans*-cariofileno; 4 – Metileugenol; 5 – 1,8-cineol; 6 – Geraniol; 7 – α -pineno; 8 – Carvacrol; 9 – Borneol; 10 – α -bisabolol; 11 – Linalol; 12 – Limoneno; 13 – Timol; 14 – 4-Alilanisol; 15 – Citral; 16 – Mirceno; 17 – *p*-cimeno; 18 – β -citronelol; 19 – Mentol; 20 – Carvona; 21 – Citronelal; 22 – *trans*-anetol; 23 – Cânfora; 24 – Cineol; 25 – α -terpineol; 26 – Precoceno; 27 – *p*-anisalaldeído; 28 – Eugenol; 29 – *trans*-farnesol.

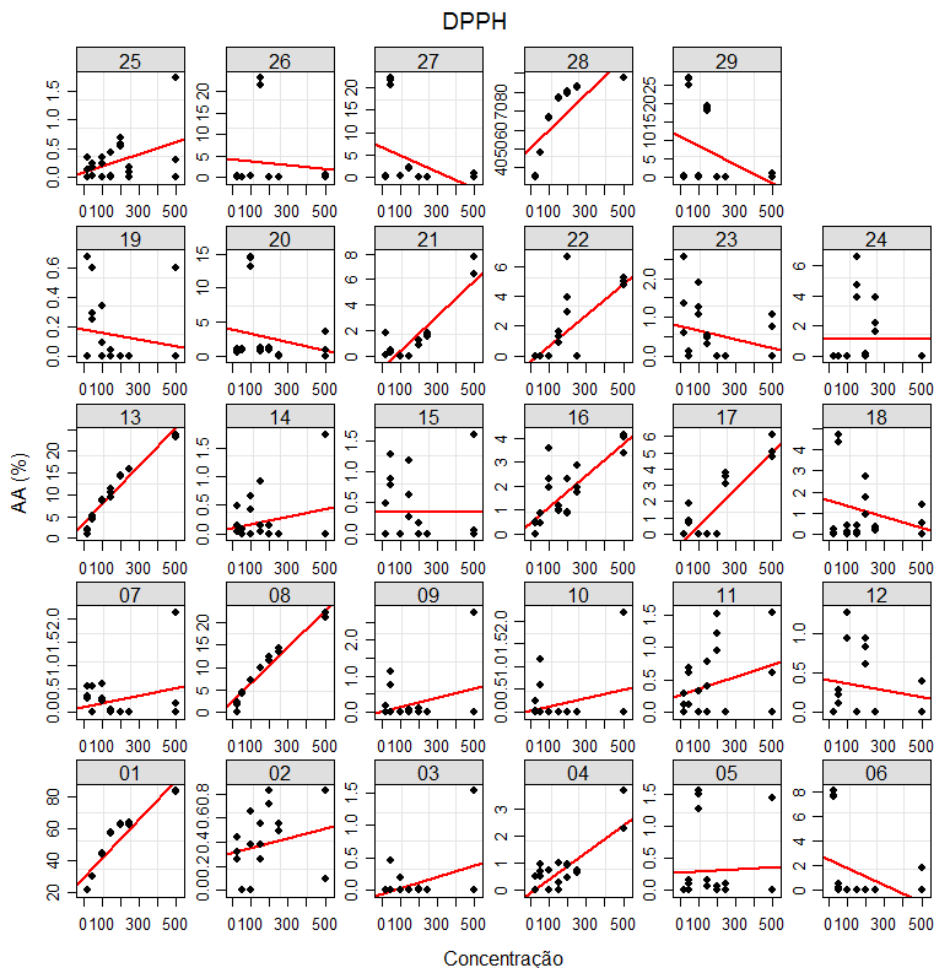
Fonte: Do autor (2018).

Pode-se observar nas Figuras 19 e 20 os compostos que estão mais propícios a apresentarem potencial antioxidante, além de ser possível visualizar o efeito da concentração sobre eles, devido à dispersão dos constituintes mais ativos. Dessa maneira, à medida que os valores de concentração aumentam, é possível notar a tendência do aumento da resposta

antioxidante para os compostos, conforme esperado, pois os compostos tendem a responder melhor nas maiores concentrações.

As Figuras 21, 22, 23 e 24 representam a resposta antioxidante em função das concentrações, separados pelos 29 diferentes compostos. Foi realizado o ajuste do modelo linear da resposta em função da concentração (regressão linear) para cada um dos compostos separadamente. A reta vermelha presente nas figuras evidencia esse ajuste e os coeficientes lineares e angulares estão apresentados no Apêndice A. A inclinação da reta permite verificar a sensibilidade da resposta em virtude das mudanças de concentrações. Observa-se que cada composto tem um valor específico inicial e final no eixo das ordenadas, o que permite verificar o comportamento dos compostos separadamente.

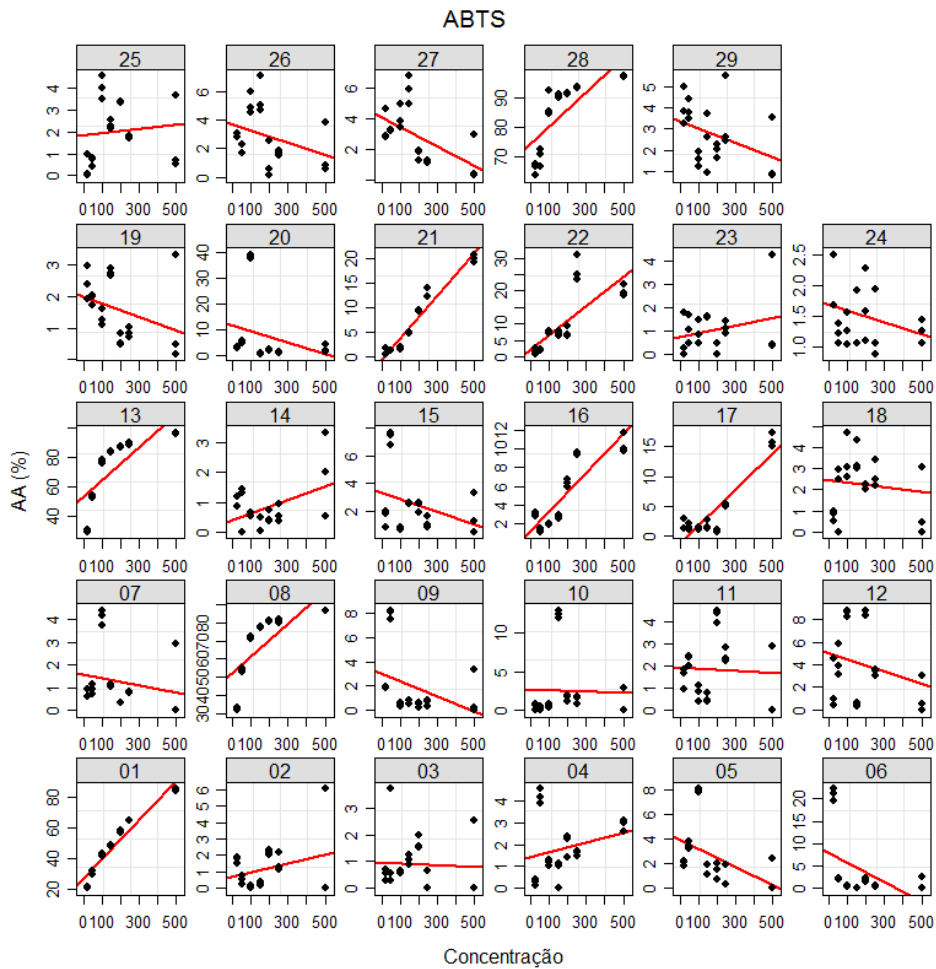
Figura 21 - Atividade antioxidante dos compostos *versus* concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) pela metodologia do DPPH – valores específicos no eixo das ordenadas.



Legenda: 1- Controle positivo; 2 – β -pineno; 3 – *trans*-cariofileno; 4 – Metileugenol; 5 – 1,8-cineol; 6 – Geraniol; 7 – α -pineno; 8 – Carvacrol; 9 – Borneol; 10 – α -bisabolol; 11 – Linalol; 12 – Limoneno; 13 – Timol; 14 – 4-Alilanisol; 15 – Citral; 16 – Mirceno; 17 – *p*-cimeno; 18 – β -citronelol; 19 – Mentol; 20 – Carvona; 21 – Citronelal; 22 – *trans*-anetol; 23 – Cânfora; 24 – Cineol; 25 – α -terpineol; 26 – Precoceno; 27 – *p*-anisaldeído; 28 – Eugenol; 29 – *trans*-farnesol.

Fonte: Do autor (2018).

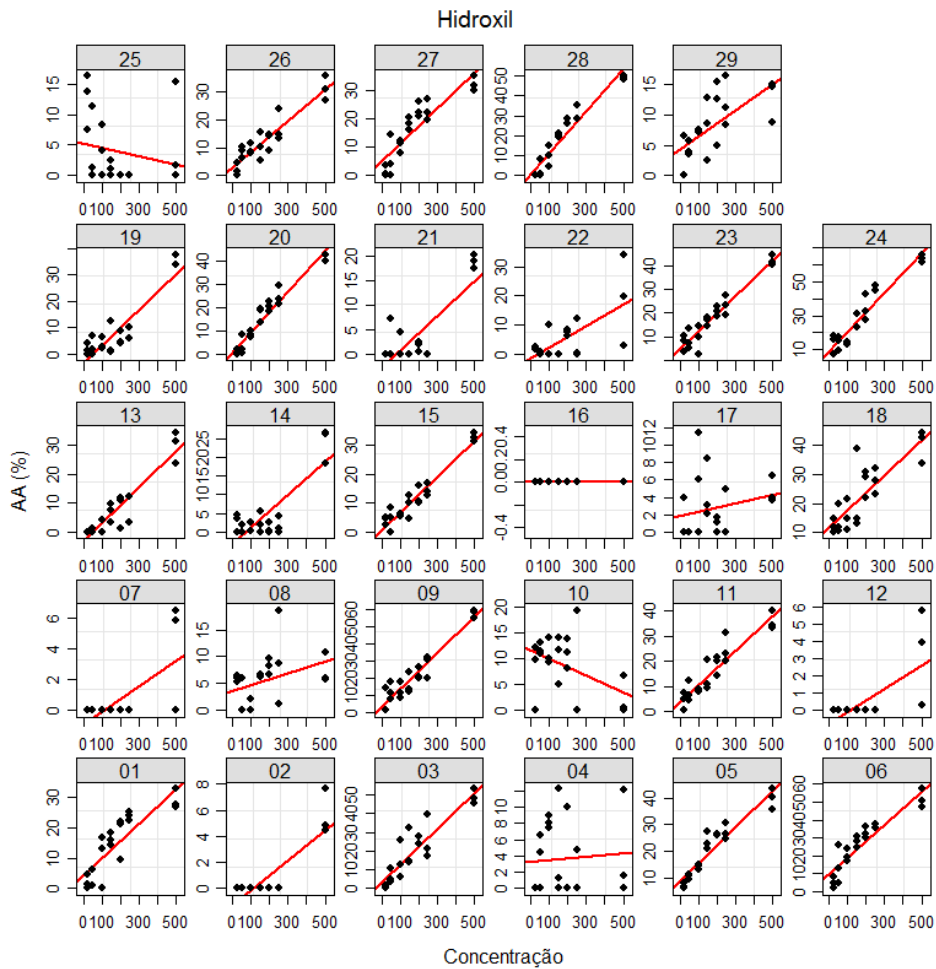
Figura 22 - Atividade antioxidante dos compostos *versus* concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) pela metodologia do ABTS – valores específicos no eixo das ordenadas.



Legenda: 1- Controle positivo; 2 – β -pineno; 3 – *trans*-cariofileno; 4 – Metileugenol; 5 – 1,8-cineol; 6 – Geraniol; 7 – α -pineno; 8 – Carvacrol; 9 – Borneol; 10 – α -bisabolol; 11 – Linalol; 12 – Limoneno; 13 – Timol; 14 – 4-Alilanisol; 15 – Citral; 16 – Mirceno; 17 – *p*-cimeno; 18 – β -citronelol; 19 – Mentol; 20 – Carvona; 21 – Citronelal; 22 – *trans*-anetol; 23 – Cânfora; 24 – Cineol; 25 – α -terpineol; 26 – Precoceno; 27 – *p*-anisaldeído; 28 – Eugenol; 29 – *trans*-farnesol.

Fonte: Do autor (2018).

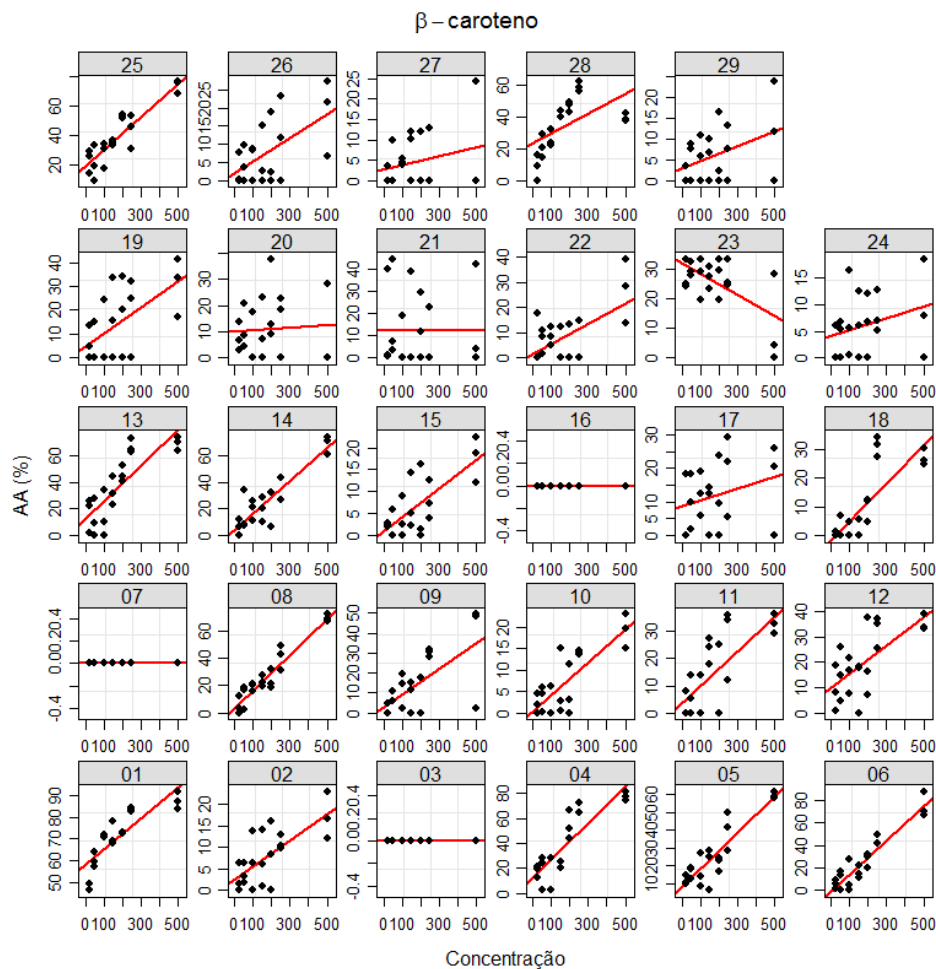
Figura 23 - Atividade antioxidante dos compostos *versus* concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) pela metodologia do hidroxil – valores específicos no eixo das ordenadas.



Legenda: 1- Controle positivo; 2 – β -pineno; 3 – *trans*-cariofileno; 4 – Metileugenol; 5 – 1,8-cineol; 6 – Geraniol; 7 – α -pineno; 8 – Carvacrol; 9 – Borneol; 10 – α -bisabolol; 11 – Linalol; 12 – Limoneno; 13 – Timol; 14 – 4-Alilanisol; 15 – Citral; 16 – Mirceno; 17 – *p*-cimeno; 18 – β -citronelol; 19 – Mentol; 20 – Carvona; 21 – Citronelal; 22 – *trans*-anetol; 23 – Cânfora; 24 – Cineol; 25 – α -terpineol; 26 – Precoceno; 27 – *p*-anisaldeído; 28 – Eugenol; 29 – *trans*-farnesol.

Fonte: Do autor (2018).

Figura 24 - Atividade antioxidante dos compostos *versus* concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) pela metodologia do β -caroteno – valores específicos no eixo das ordenadas.



Legenda: 1- Controle positivo; 2 – β -pineno; 3 – *trans*-cariofileno; 4 – Metileugenol; 5 – 1,8-cineol; 6 – Geraniol; 7 – α -pineno; 8 – Carvacrol; 9 – Borneol; 10 – α -bisabolol; 11 – Linalol; 12 – Limoneno; 13 – Timol; 14 – 4-Alilanisol; 15 – Citral; 16 – Mirceno; 17 – *p*-cimeno; 18 – β -citronelol; 19 – Mentol; 20 – Carvona; 21 – Citronelal; 22 – *trans*-anetol; 23 – Cânfora; 24 – Cineol; 25 – α -terpineol; 26 – Precoceno; 27 – *p*-anisaldeído; 28 – Eugenol; 29 – *trans*-farnesol.

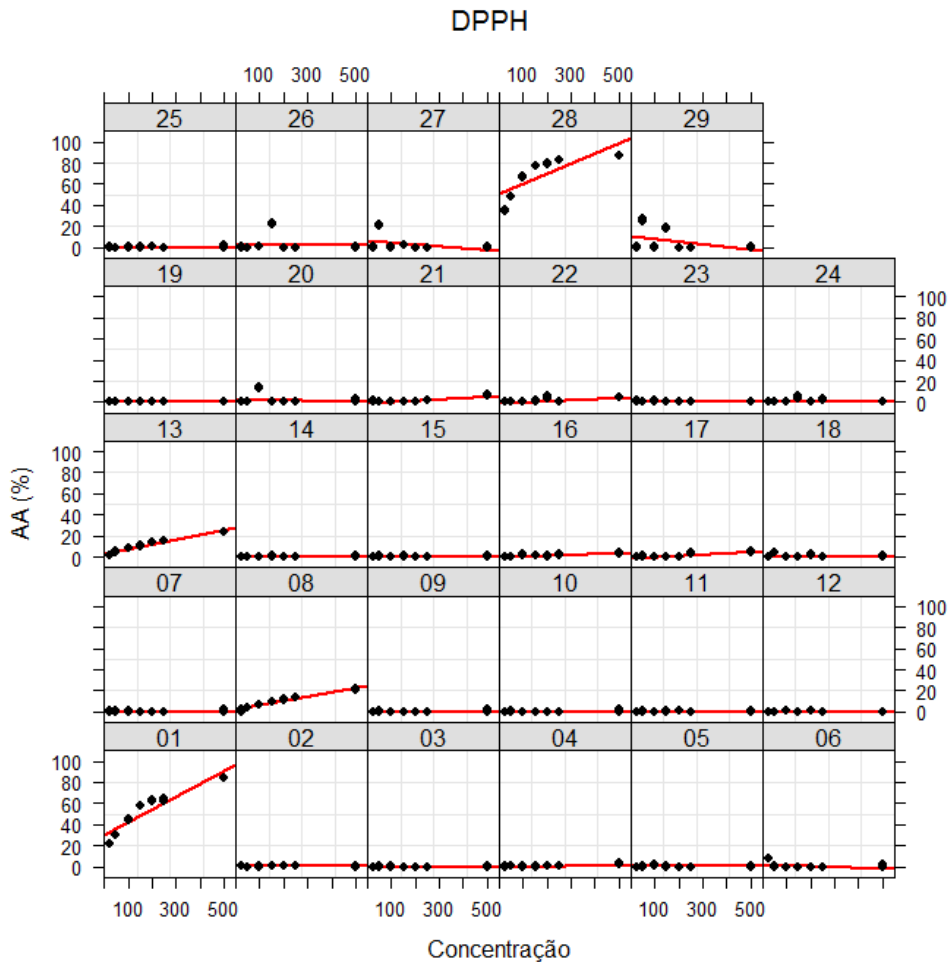
Fonte: Do autor (2018).

É possível analisar o comportamento dos compostos separadamente, e como a concentração influencia a resposta, visto que mesmo aqueles compostos que apresentaram menor atividade antioxidante mostram uma relação dose-resposta. Isso pode ser interessante na busca por compostos bioativos, podendo realizar outros testes em diferentes concentrações e até mesmo junto com outras substâncias, a fim de verificar a possibilidade de efeitos sinérgicos.

De modo análogo, as Figuras 25, 27, 29 e 31 evidenciam o potencial antioxidante em função das concentrações, separados pelos 29 compostos em gráficos que expressam a regressão linear, por meio da linha vermelha. Entretanto, os compostos estão apresentados em

valores comuns no eixo das ordenadas, o que permite analisá-los, comparando-os com o controle por meio da inclinação. Quanto menor a mudança na concentração e maior o valor de resposta, mais sensível é o composto. Compostos com inclinação semelhante à do controle apresentam atividades semelhantes. Inclinações com maior ângulo de inclinação que a do controle significa que o composto mostrou-se mais ativo que o controle e, por conseguinte, aqueles compostos que possuem retas menos inclinadas que o controle possuíram atividade menor que ele. Por fim, aqueles compostos que não apresentaram atividade também não exibiram inclinação da reta.

Figura 25 - Atividade antioxidante dos compostos *versus* concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) separados pelos 29 compostos pela metodologia do sequestro de radicais DPPH - valores únicos no eixo das ordenadas.



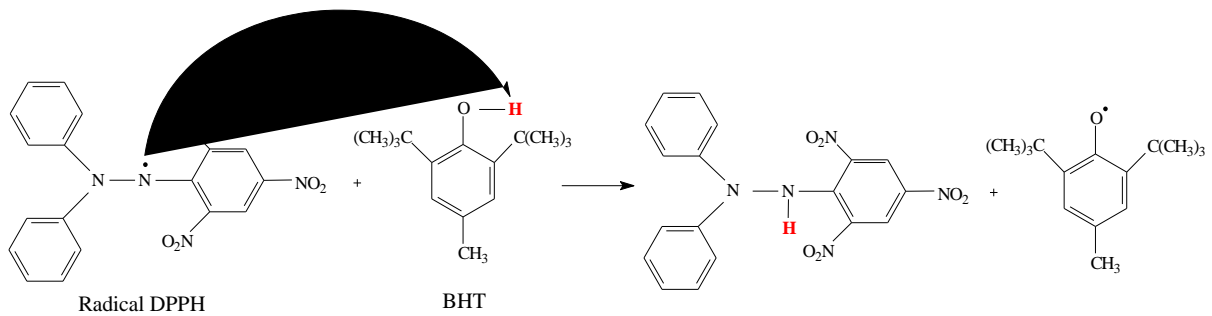
Legenda: 1- Controle positivo; 2 – β -pineno; 3 – *trans*-cariofileno; 4 – Metileugenol; 5 – 1,8-cineol; 6 – Geraniol; 7 – α -pineno; 8 – Carvacrol; 9 – Borneol; 10 – α -bisabolol; 11 – Linalol; 12 – Limoneno; 13 – Timol; 14 – 4-Alilanisol; 15 – Citral; 16 – Mirceno; 17 – *p*-cimeno; 18 – β -citronelol; 19 – Mentol; 20 – Carvona; 21 – Citronelal; 22 – *trans*-anetol; 23 – Cânfora; 24 – Cineol; 25 – α -terpineol; 26 – Precoceno; 27 – *p*-anisaldeído; 28 – Eugenol; 29 – *trans*-farnesol.

Fonte: Do autor (2018).

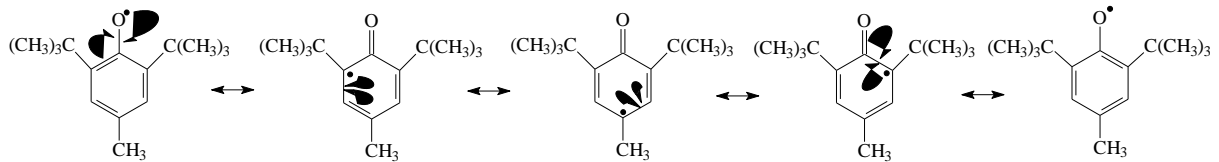
Na Figura 25 verifica-se que os compostos carvacrol (8), timol (14) e eugenol (28) apresentaram maior inclinação da reta, quando comparados com os demais. Os métodos para avaliar a capacidade antioxidante por meio do sequestro de radicais envolvem reações baseadas na transferência de hidrogênio e na transferência de elétron. O método do DPPH é um dos mais empregados, sendo comercializado na forma de radical devido à sua estabilidade (MIGUEL, 2010b).

Os compostos eugenol, carvacrol e timol são compostos fenólicos, formados por um anel aromático e um grupo hidroxila, capazes de neutralizar os radicais livres pela doação de átomos de hidrogênio ou elétrons, formando íons fenóxidos estabilizados por estruturas de ressonância. Os compostos fenólicos são considerados a principal classe de compostos com elevada atividade antioxidante. Observou-se que o eugenol apresentou maior atividade do que os isômeros carvacrol e timol, e isso pode estar relacionado ao fato de possuir não só estrutura fenólica, mas também dois átomos de oxigênio eletronegativos, o que facilita a doação de prótons e elétrons, a fim de estabilizar o radical formado. Na Figura 26 observa-se a reação de estabilização do radical DPPH pelo antioxidante sintético BHT, seguida por estruturas de ressonância, a fim de estabilizar o radical formado.

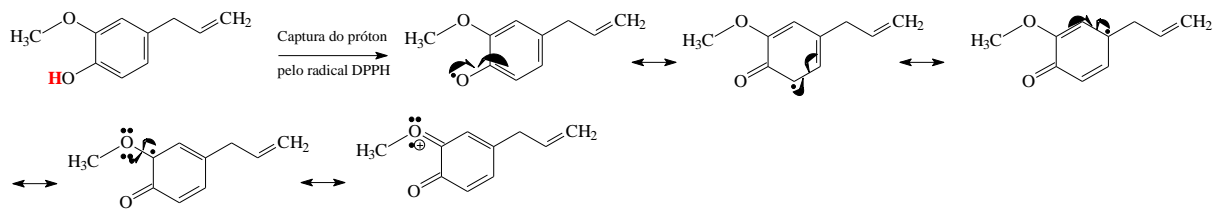
Figura 26 – Provável mecanismo que explica a redução do radical DPPH e a estabilização por ressonância do radical formado nos compostos BHT e eugenol.



Estabilização do BHT:



Estabilização do eugenol:

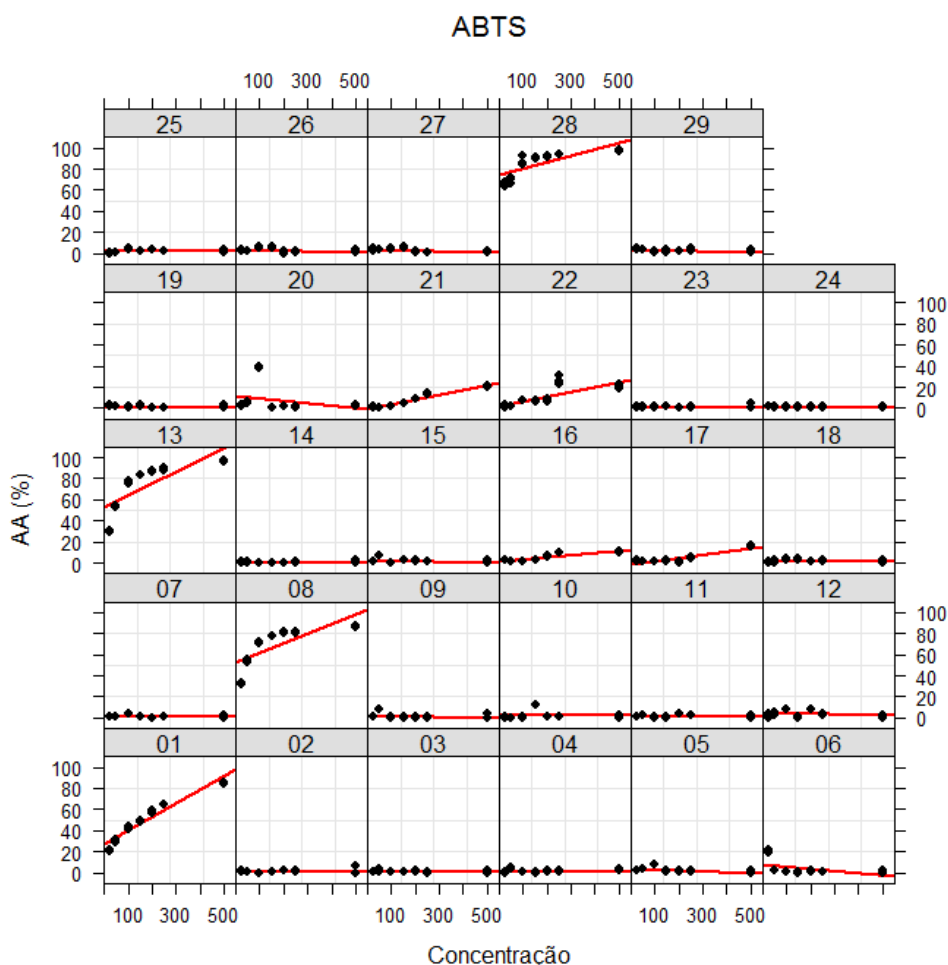


Fonte: Do autor (2018).

Diante do mecanismo proposto, pode-se justificar o fato de os demais compostos não apresentarem atividade diante desse método, uma vez que não apresentam estrutura propícia à doação de próton e elétron, com a finalidade de estabilizar o radical formado. A atividade antioxidante pode ser visualizada no próprio meio reacional, após o período de reação, devido à mudança de coloração dos compostos mais ativos.

De modo similar à Figura 25, a Figura 27 exibe o potencial antioxidante em função das concentrações, separados pelos diferentes compostos em gráficos que revelam a regressão linear pelo método ABTS. Em geral, os resultados obtidos por esse método fornecem maior valor de resposta, frente aos compostos, quando comparado com o teste do DPPH, visto que é mais reativo devido ao menor impedimento estérico na molécula. Isso pode ser observado na Figura 27, em que há mais compostos ativos.

Figura 27 - Atividade antioxidante dos compostos *versus* concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) pela metodologia do ABTS - valores únicos no eixo das ordenadas.



Legenda: 1- Controle positivo; 2 – β -pineno; 3 – *trans*-cariofileno; 4 – Metileugenol; 5 – 1,8-cineol; 6 – Geraniol; 7 – α -pineno; 8 – Carvacrol; 9 – Borneol; 10 – α -bisabolol; 11 – Linalol; 12 – Limoneno; 13 – Timol; 14 – 4-Alilanisol; 15 – Citral; 16 – Mirceno; 17 – *p*-cimeno; 18 – β -citronelol; 19 – Mentol; 20 – Carvona; 21 – Citronelal; 22 – *trans*-anetol; 23 – Cânfora; 24 – Cineol; 25 – α -terpineol; 26 – Precoceno; 27 – *p*-anisaldeído; 28 – Eugenol; 29 – *trans*-farnesol.

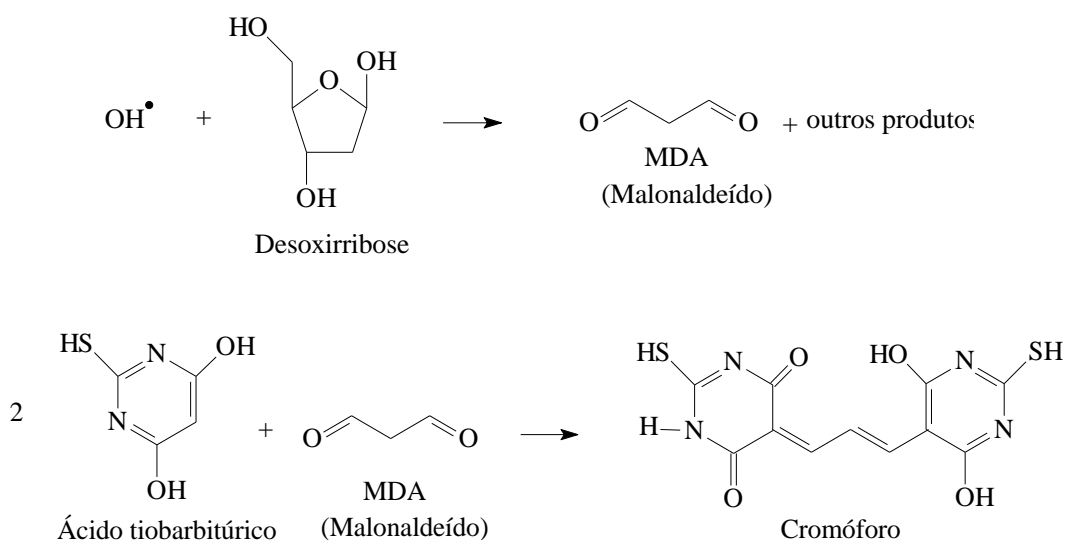
Fonte: Do autor (2018).

A vantagem do radical ABTS é sua alta reatividade e provavelmente a capacidade de reagir com uma gama mais ampla de antioxidantes. Por outro lado, a preparação do reagente ABTS é mais difícil e sua estabilidade é menor, em comparação com DPPH. Assim como o DPPH, o método do ABTS está baseado na habilidade de os antioxidantes estabilizarem o cátion $\text{ABTS}^{+\cdot}$, pela doação de um próton ou elétron. Com a adição de um antioxidante, ocorre a redução do $\text{ABTS}^{+\cdot}$ a ABTS, promovendo a perda da coloração do meio reacional e, portanto decréscimo na absorbância. O radical ABTS é menos impedido estericamente do que o radical DPPH; por esse motivo, há maior probabilidade de os compostos serem mais ativos frente a esse método, pois o radical ABTS está menos protegido, o que facilita a recepção de um próton ou elétron (MAREČEK et al., 2017).

Dessa maneira, os compostos fenólicos eugenol, carvacrol e timol foram mais efetivos na estabilização de radicais por esse método do que pelo método do DPPH, como pode ser observado nas Figuras 25 e 27. Além disso, outros compostos, como o mirceno (16), *p*-cimeno (17), citronelal (21) e *trans*-anetol (22) apresentaram baixa atividade antioxidante, quando comparados com o controle. Apesar de baixo potencial antioxidante, observa-se que esses compostos aumentaram a resposta antioxidante, ao aumentar os valores das concentrações, apresentando uma relação de dose-resposta.

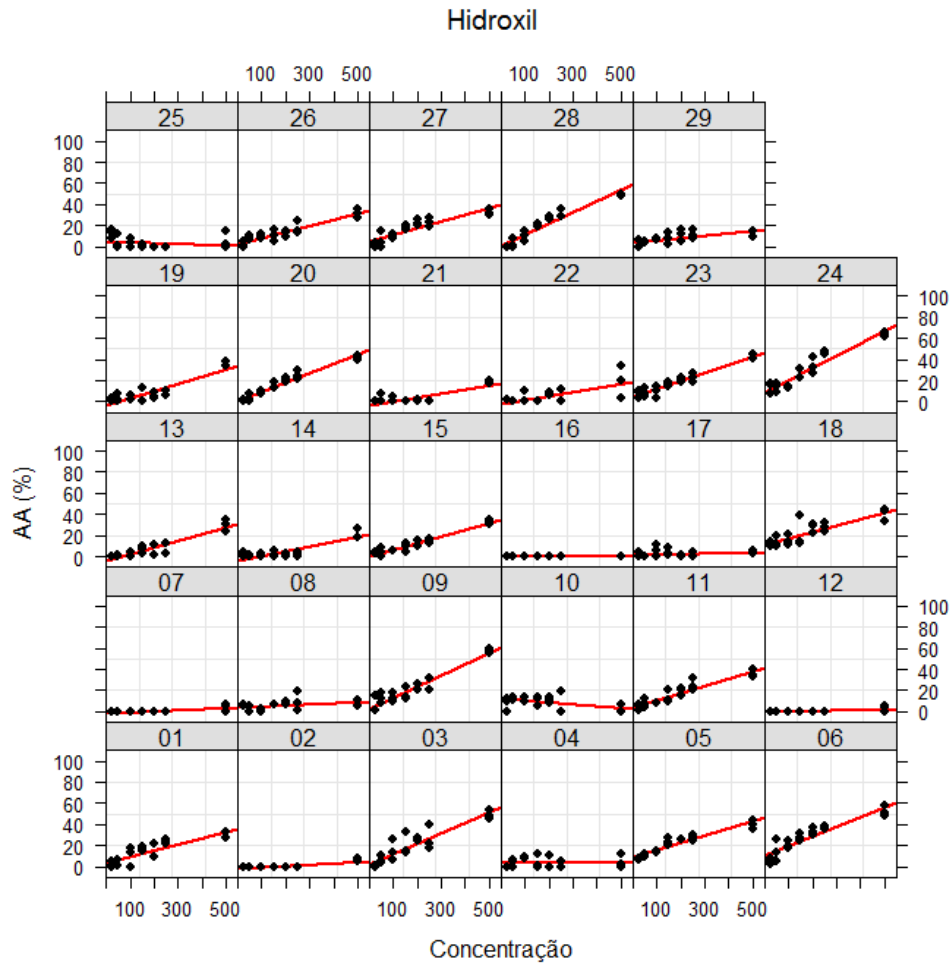
Entre os radicais de oxigênio, o radical hidroxil é uma das espécies mais reativas, induzindo danos severos às biomoléculas auxiliares. Há várias maneiras de verificar a capacidade de formar radicais hidroxílicos e um deles é o teste envolvendo a desoxirribose. Os radicais hidroxil são formados na clássica reação de Fenton, a fim de degradar o açúcar 2-desoxirribose em diversos fragmentos, como o malonaldeído, que irá reagir com o ácido tiobarbitúrico e formar um cromóforo de coloração rosa (Figura 28). Na Figura 29 verifica-se a atividade antioxidante dos compostos pelo método hidroxil (SHIVAKUMAR; KUMAR, 2018).

Figura 28 – Mecanismo de formação do cromóforo no teste hidroxil a partir da degradação da 2-desoxirribose, seguida da reação do ácido tiobarbitúrico e malonaldeído. (Continua)



Fonte: Shivakumar; Kumar (2018).

Figura 29 - Atividade antioxidante dos compostos *versus* concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) pela metodologia do hidroxil - valores únicos no eixo das ordenadas.



Legenda: 1- Controle positivo; 2 – β -pineno; 3 – *trans*-cariofileno; 4 – Metileugenol; 5 – 1,8-cineol; 6 – Geraniol; 7 – α -pineno; 8 – Carvacrol; 9 – Borneol; 10 – α -bisabolol; 11 – Linalol; 12 – Limoneno; 13 – Timol; 14 – 4-Alilanol; 15 – Citral; 16 – Mirceno; 17 – *p*-cimeno; 18 – β -citronelol; 19 – Mentol; 20 – Carvona; 21 – Citronelal; 22 – *trans*-anetol; 23 – Cânfora; 24 – Cineol; 25 – α -terpineol; 26 – Precoceno; 27 – *p*-anisaldeído; 28 – Eugenol; 29 – *trans*-farnesol.

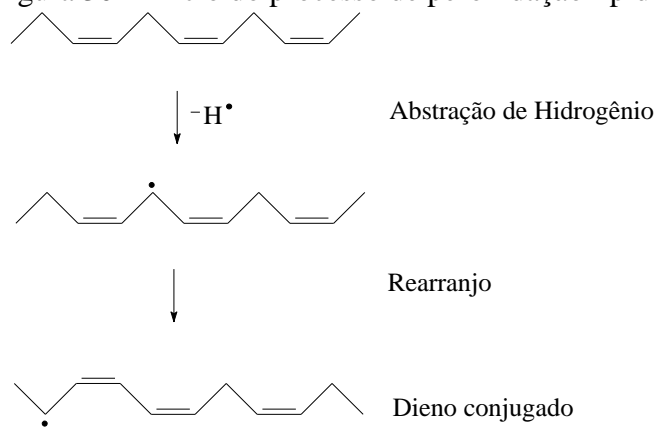
Fonte: Do autor (2018).

Na Figura 29 pode-se observar que o controle manitol revelou uma porcentagem na inibição do radical hidroxil em torno de 40% na concentração de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$. Outros compostos, como o 1,8-cineol (5), linalol (11), timol (13), citral (15), β -citronelal (18), mentol (19), carvona (20), *trans*-anetol (22), cânfora (23), precoceno (26) e *p*-anisaldeído (27), também apresentaram potencial na inibição do radical hidroxil em torno deste mesmo valor (40%). Outros, por sua vez, apresentaram atividade maior que o controle, como é o caso do *trans*-cariofileno (3), geraniol (6), borneol (9), cineol (24) e eugenol (28). Esses compostos

que apresentam potencial antioxidante competem com a 2-desoxirribose pelo radical, acarretando diminuição da absorvância, provocada pelo decréscimo da degradação do açúcar.

A peroxidação lipídica é uma reação em cadeia iniciada pela abstração de um átomo de hidrogênio ou adição de uma espécie radicalar que contém oxigênio, resultando dano oxidativo de ácidos graxos insaturados. Dessa forma, a presença de uma ligação dupla adjacente a um grupo metilênico torna a ligação metilênica C-H fraca e, assim, o hidrogênio se torna mais susceptível à abstração. Isso faz com que fique um elétron não emparelhado em um carbono central, estabilizado por meio de um rearranjo molecular das duplas ligações para formar um dieno conjugado que se combina com o oxigênio para formar um radical peroxil (Figura 30). Esse radical peroxil formado pode abstrair um átomo de hidrogênio de outro ácido graxo insaturado e, então, iniciar a reação em cadeia (REPETTO; SEMPRINE; BOVERIS, 2012).

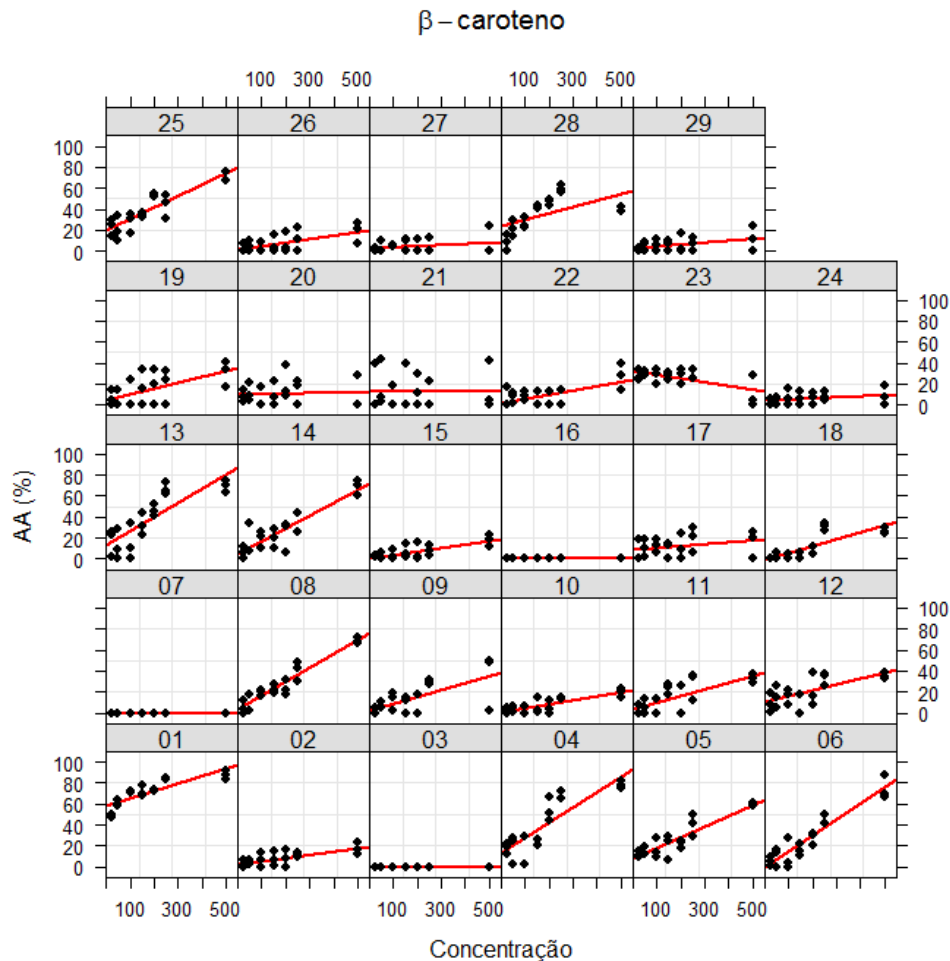
Figura 30 – Início do processo de peroxidação lipídica.



Fonte: Repetto; Semprine; Boveris (2012).

O ensaio antioxidante β -caroteno/ácido linoleico avalia a capacidade dos constituintes dos óleos essenciais em retardar ou inibir a formação de radicais livres gerados no processo de peroxidação do ácido linoleico. Na Figura 31 observa-se a capacidade antioxidante dos compostos frente a este método.

Figura 31- Atividade antioxidante dos compostos *versus* concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) pela metodologia do β -caroteno – valores únicos no eixo das ordenadas.



Legenda: 1- Controle positivo; 2 – β -pineno; 3 – *trans*-cariofileno; 4 – Metileugenol; 5 – 1,8-cineol; 6 – Geraniol; 7 – α -pineno; 8 – Carvacrol; 9 – Borneol; 10 – α -bisabolol; 11 – Linalol; 12 – Limoneno; 13 – Timol; 14 – 4-Alilanol; 15 – Citral; 16 – Mirceno; 17 – *p*-cimeno; 18 – β -citronelol; 19 – Mentol; 20 – Carvona; 21 – Citronelal; 22 – *trans*-anetol; 23 – Cânfora; 24 – Cineol; 25 – α -terpineol; 26 – Precoceno; 27 – *p*-anisalaldeído; 28 – Eugenol; 29 – *trans*-farnesol.

Fonte: Do autor (2018).

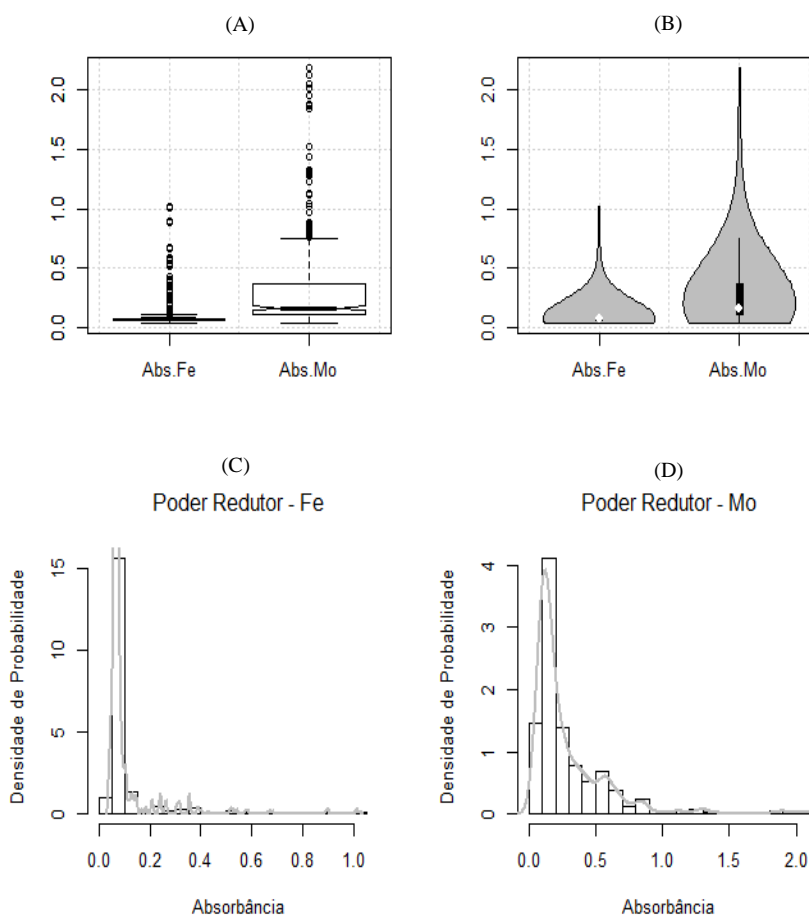
É possível observar pela Figura 31 que o BHT empregado como controle positivo apresentou atividade antioxidante em torno de 90%, na concentração de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$. Compostos como o metileugenol (4), geraniol (6), carvacrol (8), timol (13), 4-alilanol (14) e α -terpineol (25), também se destacaram por esse método, revelando alta atividade antioxidante. De acordo com os resultados, constata-se que compostos polares são efetivos em proteger a oxidação do ácido linoleico e, assim, evitar a degradação do β -caroteno. Isso vai de encontro com o estudo de Kulisic e colaboradores (2004), que citam as associações entre a

diminuição da absorbância do β -caroteno na presença do óleo essencial de orégano, bem como em suas diferentes frações ou constituintes individuais. Os autores observaram que a fração que contém o grupo aldólico foi a mais eficaz e sugerem que a atividade antioxidante do óleo essencial de orégano provavelmente seja devido a constituintes mais polares.

As reações de redução e oxidação são fundamentais nos processos que envolvem reações químicas biológicas. Íons metálicos, como o Fe^{3+} e o Mo^{6+} , são largamente empregados em testes que avaliam o potencial antioxidante de diferentes substratos. Esses testes baseiam-se na redução desses metais, por meio da transferência de elétrons por uma substância antioxidante e a atividade é determinada pelo aumento dos valores de absorbância.

A Figura 32 apresenta o perfil de resposta dos compostos analisados por meio dos ensaios do poder redutor do ferro e redução do molibdênio, de forma independente dos compostos e das concentrações, em que (A) representa um gráfico do tipo boxplot, (B) um gráfico do tipo violino e (C) e (D) histogramas. Ressalta-se que as análises são sistematizadas, seguindo os mesmos padrões de análise, diferindo quanto às respostas antioxidantes, dadas em porcentagem de atividade e em valores de absorbância. Além disso, eles permitem observar que, de maneira geral, os compostos apresentaram baixa atividade antioxidante pelas metodologias de redução de íons metálicos, pois há maior concentração de compostos na base do gráfico do tipo violino e barras mais acentuadas na região próxima de zero no histograma de densidade.

Figura 32 – Distribuição das respostas em relação à resposta de atividade antioxidante (AA%) analisada por metodologias que envolvem a redução de íons metálicos.



Os “boxes” presentes na subfigura (A) indicam que 50% dos compostos avaliados no poder redutor do ferro e na redução do molibdênio apresentaram pouca mudança de coloração, devido aos valores baixos de absorvância, que não indicam transição de cor. Os valores de absorvância encontram-se na região em torno de $0,1 \text{ nm}^{-1}$ para o poder redutor do ferro e em torno de $0,2\text{-}0,4 \text{ nm}^{-1}$ para o ensaio de redução do molibdênio, em escalas no eixo das ordenadas, que vão de aproximadamente $0,0\text{-}1,0$ a $0,0\text{-}2,0 \text{ nm}^{-1}$, respectivamente.

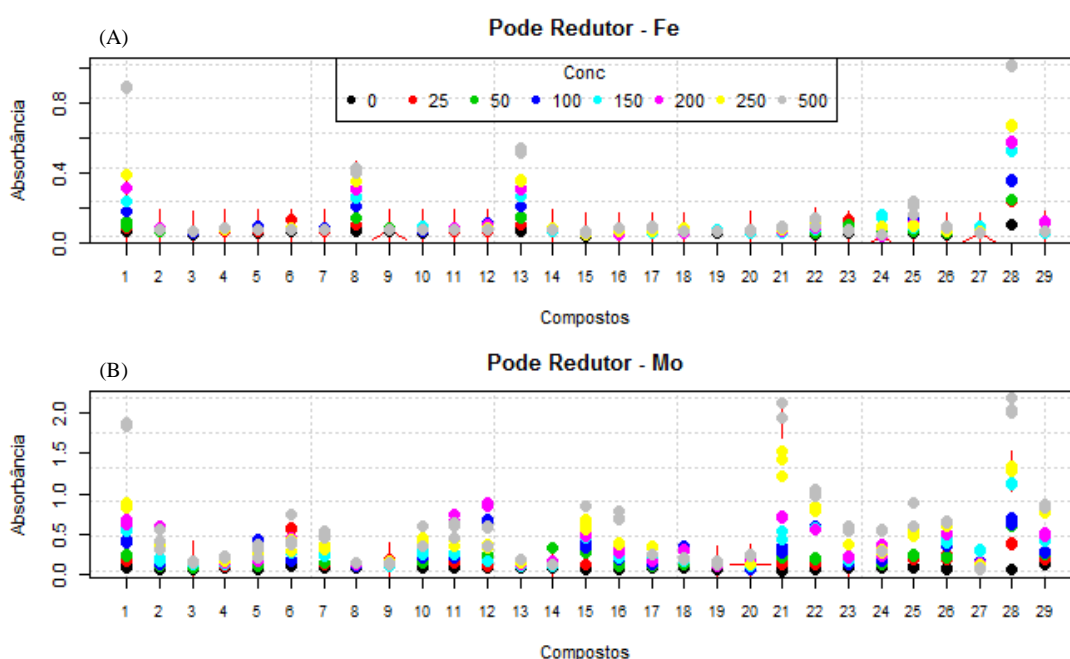
Na subfigura (B), é possível verificar que a maior parte dos compostos estão localizados na base do gráfico (silhueta), o que indica pouca variação na coloração dos testes. Como o formato da silhueta é uma estimativa da distribuição das respostas, verifica-se que houve baixa atividade antioxidante.

A linha cinza sobreposta nos histogramas (C) e (D) evidenciam o perfil das respostas diante dos testes empregados. Observa-se que os compostos estão mais distribuídos em faixas

de pouca variação nos valores de absorvância, indicando que a maior parte desses não apresentaram potencial em reduzir os íons metálicos.

A Figura 33 exibe os dados, levando em consideração as concentrações empregadas no experimento, cujos valores são 25, 50, 100, 150, 200, 250 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, permitindo identificar os compostos juntamente com as concentrações em que apresentaram atividade. Os valores estão expressos em termos de absorvância, pois quanto maior o potencial da substância antioxidante em reduzir os íons metálicos, maior o valor da absorvância, visto que os testes são baseados na mudança de coloração que ocorre devido à capacidade de redução.

Figura 33 – Valores de absorvância (nm^{-1}) dos compostos pelas metodologias que envolvem a redução de íons metálicos juntamente com suas respectivas concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$).



Legenda: 1- Controle positivo; 2 – β -pineno; 3 – *trans*-cariofileno; 4 – Metileugenol; 5 – 1,8-cineol; 6 – Geraniol; 7 – α -pineno; 8 – Carvacrol; 9 – Borneol; 10 – α -bisabolol; 11 – Linalol; 12 – Limoneno; 13 – Timol; 14 – 4-Alilanisol; 15 – Citral; 16 – Mirceno; 17 – *p*-cimeno; 18 – β -citronelol; 19 – Mentol; 20 – Carvona; 21 – Citronelal; 22 – *trans*-anetol; 23 – Cânfora; 24 – Cineol; 25 – α -terpineol; 26 – Precoceno; 27 – *p*-anisalaldeído; 28 – Eugenol; 29 – *trans*-farnesol.

Fonte: Do autor (2018).

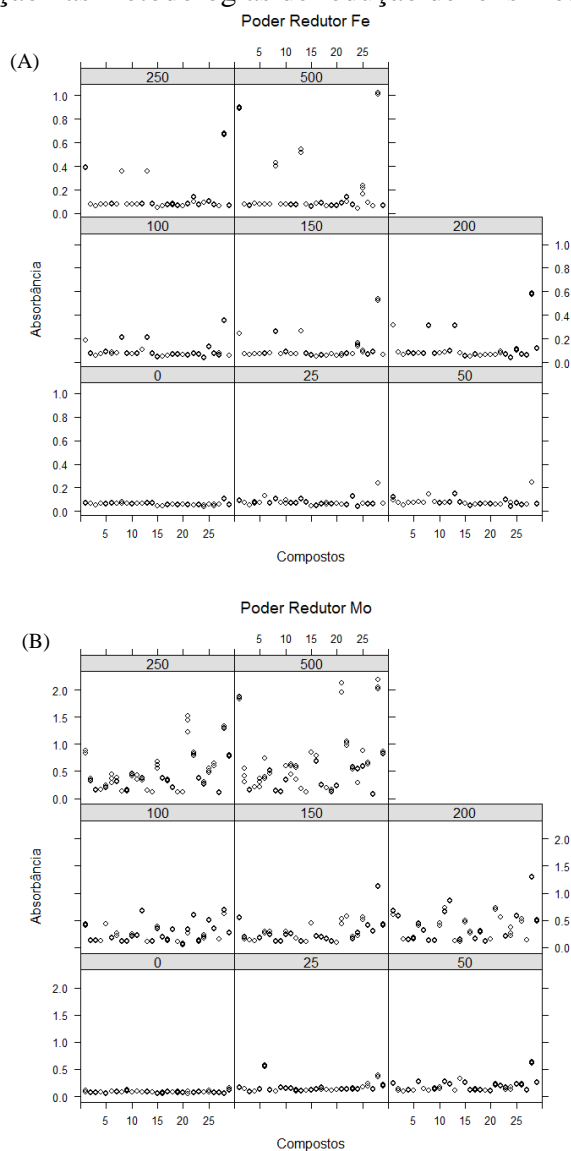
Nota-se que o eixo das ordenadas no ensaio envolvendo a redução do ferro vai de 0,0 a 1,0 nm^{-1} e o teste de redução do molibdênio, em torno de 0,0 a 2,0 nm^{-1} . É possível identificar que no teste do poder redutor do Fe^{3+} , os compostos com maior poder de redução foram o carvacrol (8), timol (13) e eugenol (8), sendo esse último mais eficaz que o próprio controle. Nesse ensaio, a presença de antioxidantes provoca a redução do complexo ferricianeto/ Fe^{3+} à

forma ferrosa/ Fe^{2+} . Portanto, medir a formação do azul da Prússia é uma forma de monitorar a concentração de Fe^{2+} .

Já no teste do fosfomolibdato, os compostos mais ativos foram o citronelal (21) e o eugenol (28), ambos com maior poder de redução que o controle. Esse teste baseia-se no fato de o Mo^{6+} ser reduzido a Mo^{5+} , na presença de um agente redutor (antioxidante), formando um complexo verde de fosfomolibdato avaliado espectrofotometricamente a 695 nm.

A Figura 34 exibe gráficos de dispersão dos valores em função dos 29 compostos, separados pela variável concentração, com a finalidade de facilitar a análise visual dos dados.

Figura 34 – Dispersão dos valores da atividade dos compostos separados pela variável concentração nas metodologias de redução de íons metálicos.



Legenda: 1- Controle positivo; 2 – β -pineno; 3 – *trans*-cariofileno; 4 – Metileugenol; 5 – 1,8-cineol; 6 – Geraniol; 7 – α -pineno; 8 – Carvacrol; 9 – Borneol; 10 – α -bisabolol; 11 – Linalol; 12 – Limoneno;

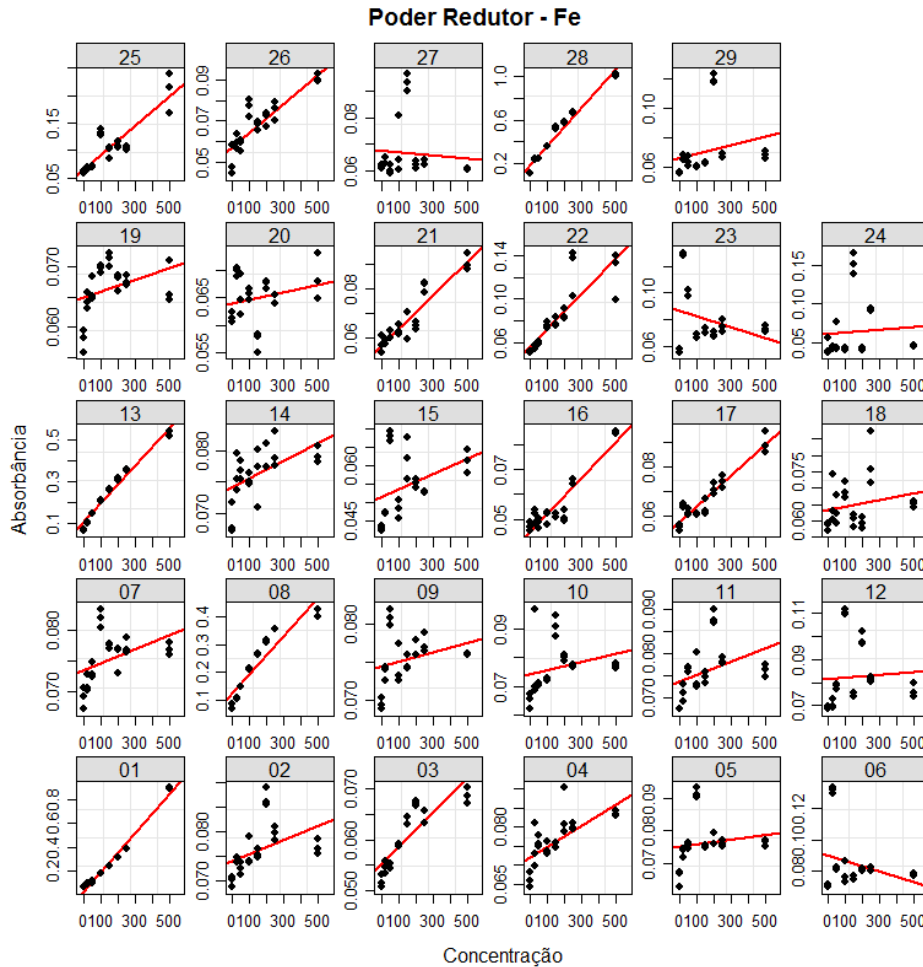
13 – Timol; 14 – 4-Alilanisol; 15 – Citral; 16 – Mirceno; 17 – *p*-cimeno; 18 – β -citronelol; 19 – Mentol; 20 – Carvona; 21 – Citronelal; 22 – *trans*-anetol; 23 – Cânfora; 24 – Cineol; 25 – α -terpineol; 26 – Precoceno; 27 – *p*-anisalaldeído; 28 – Eugenol; 29 – *trans*-farnesol.

Fonte: Do autor (2018).

A Figura 34 revela o efeito da concentração nos compostos de forma separada, mostrando os compostos que estão mais propícios a apresentarem atividade antioxidante por meio das dispersões observadas pelos constituintes mais ativos. Espera-se que os compostos sejam mais ativos nas maiores concentrações; dessa forma, a medida que os valores de concentração aumentam, observa-se maior dispersão das respostas nos gráficos.

As Figuras 35 e 36 mostram a resposta antioxidante em função das concentrações, separadas pelos 29 compostos. Os valores de resposta em função da concentração foram apresentados na forma de regressão linear e a reta vermelha representa o ajuste linear realizado. Os valores dos coeficientes lineares e angulares estão descritos no Apêndice A. Verifica-se que cada composto tem um valor específico inicial e final no eixo das ordenadas, o que facilita a análise do comportamento dos compostos separadamente.

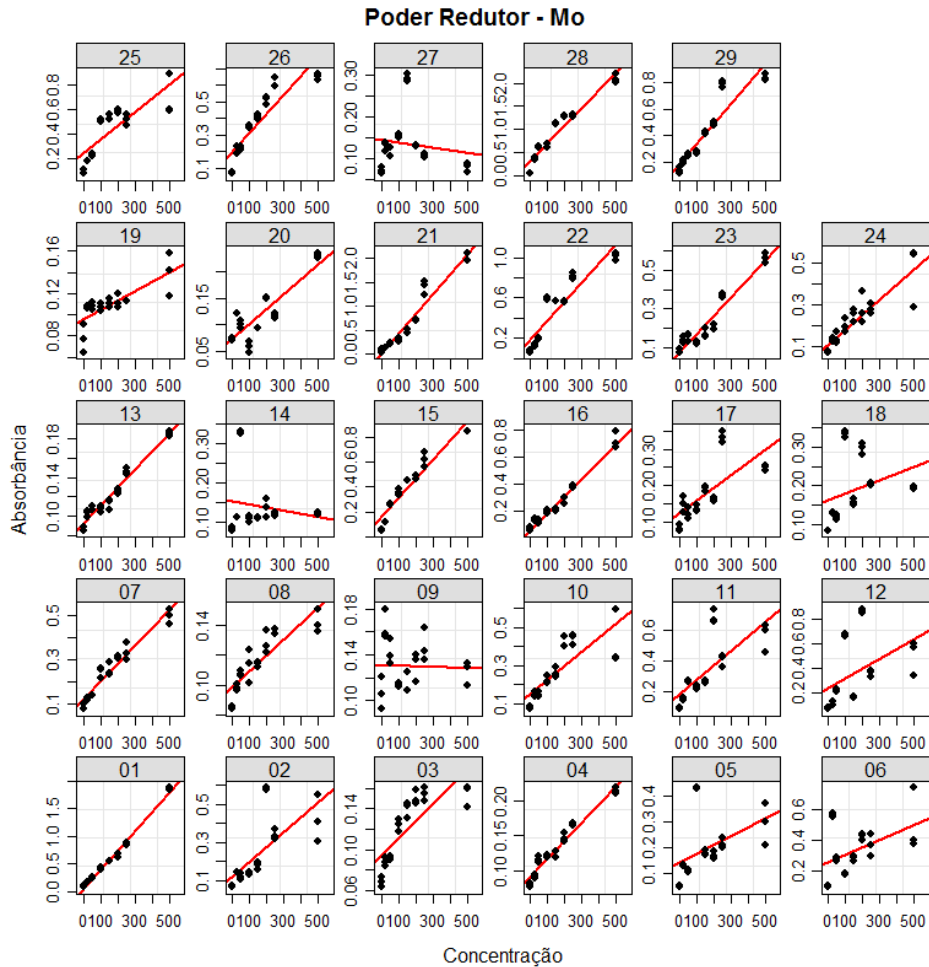
Figura 35 - Atividade antioxidante dos compostos *versus* concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) pela metodologia do poder redutor do ferro – valores específicos no eixo das ordenadas.



Legenda: 1- Controle positivo; 2 – β -pineno; 3 – *trans*-cariofileno; 4 – Metileugenol; 5 – 1,8-cineol; 6 – Geraniol; 7 – α -pineno; 8 – Carvacrol; 9 – Borneol; 10 – α -bisabolol; 11 – Linalol; 12 – Limoneno; 13 – Timol; 14 – 4-Alilanisol; 15 – Citral; 16 – Mirceno; 17 – *p*-cimeno; 18 – β -citronelol; 19 – Mentol; 20 – Carvona; 21 – Citronelal; 22 – *trans*-anetol; 23 – Cânfora; 24 – Cineol; 25 – α -terpineol; 26 – Precoceno; 27 – *p*-anisalaldeído; 28 – Eugenol; 29 – *trans*-farnesol.

Fonte: Do autor (2018).

Figura 36 - Atividade antioxidante dos compostos *versus* concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) pela metodologia de redução do molibdênio – valores específicos no eixo das ordenadas.

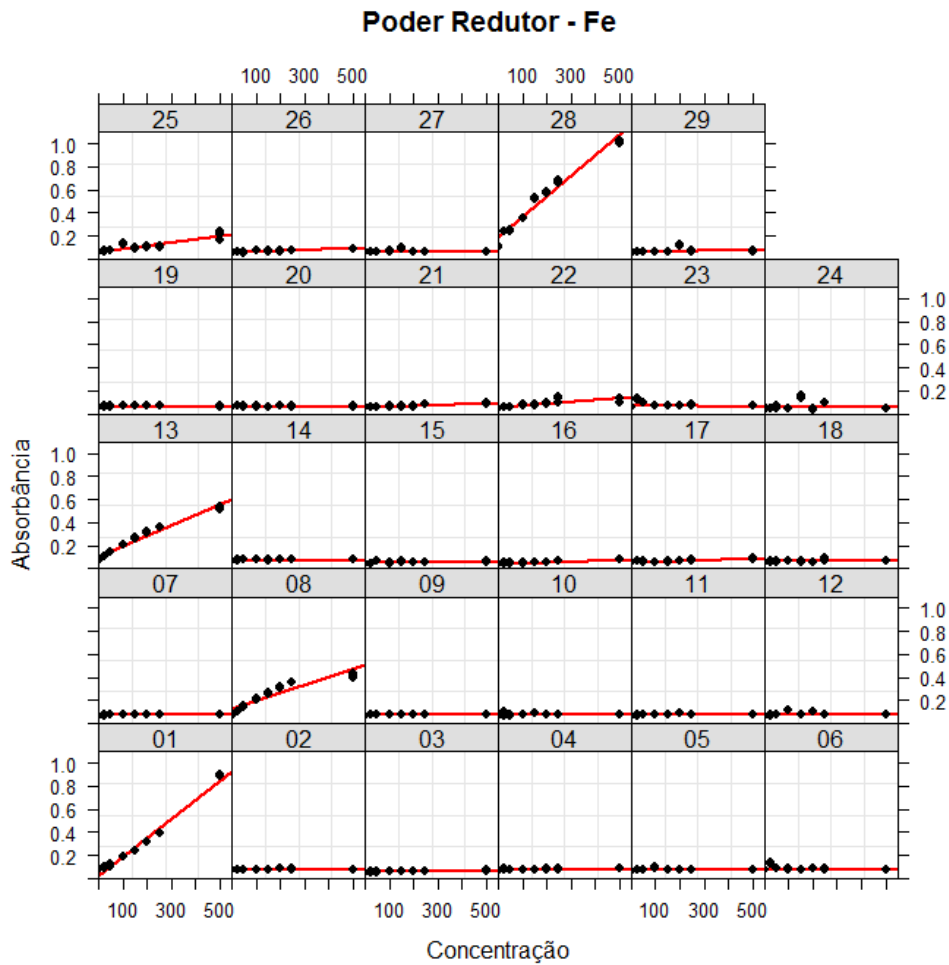


Legenda: 1- Controle positivo; 2 – β -pineno; 3 – *trans*-cariofileno; 4 – Metileugenol; 5 – 1,8-cineol; 6 – Geraniol; 7 – α -pineno; 8 – Carvacrol; 9 – Borneol; 10 – α -bisabolol; 11 – Linalol; 12 – Limoneno; 13 – Timol; 14 – 4-Alilanisol; 15 – Citral; 16 – Mirceno; 17 – *p*-cimeno; 18 – β -citronelol; 19 – Mentol; 20 – Carvona; 21 – Citronelal; 22 – *trans*-anetol; 23 – Cânfora; 24 – Cineol; 25 – α -terpineol; 26 – Precoceno; 27 – *p*-anisaldeído; 28 – Eugenol; 29 – *trans*-farnesol.

Fonte: Do autor (2018).

É possível analisar os compostos separadamente e a influência da concentração sobre eles, mesmo para os compostos menos ativos, observando-se um efeito dose-resposta. As Figuras 37 e 38 apresentam os compostos em valores comuns no eixo das ordenadas, o que permite analisá-los, comparando-os com o controle por meio da inclinação da reta (linha vermelha).

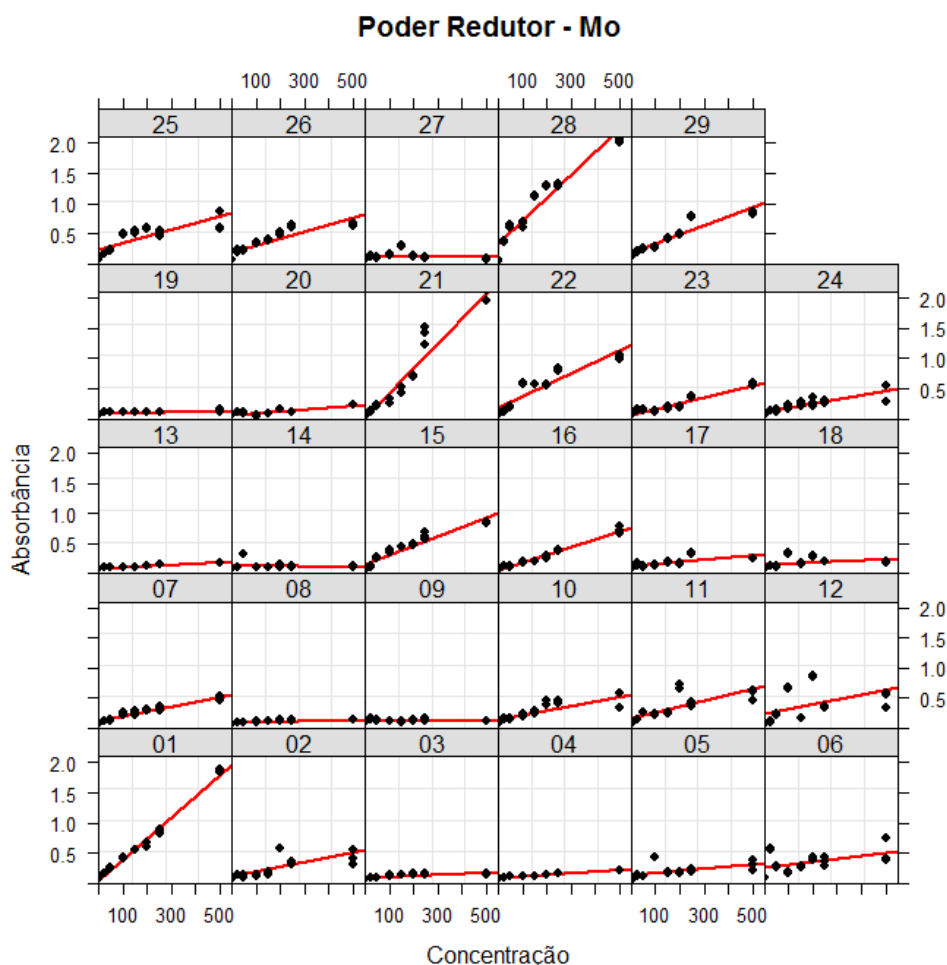
Figura 37- Atividade antioxidante dos compostos *versus* concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) pela metodologia do poder redutor do ferro - valores únicos no eixo das ordenadas.



Legenda: 1- Controle positivo; 2 – β -pineno; 3 – *trans*-cariofileno; 4 – Metileugenol; 5 – 1,8-cineol; 6 – Geraniol; 7 – α -pineno; 8 – Carvacrol; 9 – Borneol; 10 – α -bisabolol; 11 – Linalol; 12 – Limoneno; 13 – Timol; 14 – 4-Alilanisol; 15 – Citral; 16 – Mirceno; 17 – *p*-cimeno; 18 – β -citronelol; 19 – Mentol; 20 – Carvona; 21 – Citronelal; 22 – *trans*-anetol; 23 – Cânfora; 24 – Cineol; 25 – α -terpineol; 26 – Precoceno; 27 – *p*-anisalaldeído; 28 – Eugenol; 29 – *trans*-farnesol.

Fonte: Do autor (2018).

Figura 38 - Atividade antioxidante dos compostos *versus* concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) pela metodologia da redução do molibdênio - valores únicos no eixo das ordenadas.



Legenda: 1- Controle positivo; 2 – β -pineno; 3 – *trans*-cariofileno; 4 – Metileugenol; 5 – 1,8-cineol; 6 – Geraniol; 7 – α -pineno; 8 – Carvacrol; 9 – Borneol; 10 – α -bisabolol; 11 – Linalol; 12 – Limoneno; 13 – Timol; 14 – 4-Alilanisol; 15 – Citral; 16 – Mirceno; 17 – *p*-cimeno; 18 – β -citronelol; 19 – Mentol; 20 – Carvona; 21 – Citronelal; 22 – *trans*-anetol; 23 – Cânfora; 24 – Cineol; 25 – α -terpineol; 26 – Precoceno; 27 – *p*-anisaldeído; 28 – Eugenol; 29 – *trans*-farnesol.

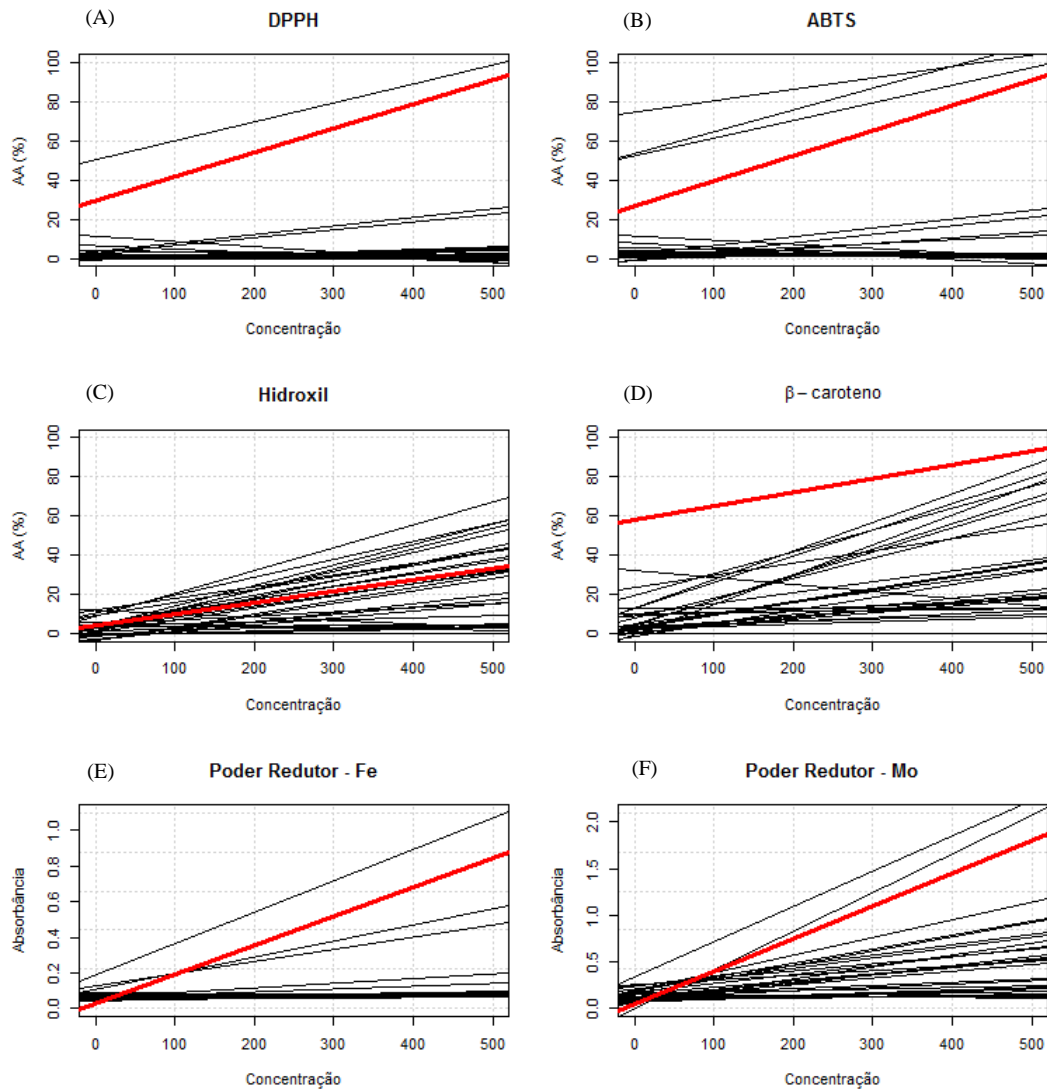
Fonte: Do autor (2018).

Pela Figura 37, observa-se que os compostos carvacrol (8), timol (13) e eugenol (28) mostraram potencial em reduzir o Fe^{3+} em Fe^{2+} , sendo o eugenol mais eficaz que o próprio controle empregado. A Figura 38 revela que os compostos citronelal (21) e eugenol (28) possuem elevada capacidade em reduzir o Mo^{6+} em Mo^{5+} , com valores de absorvância maiores que o do controle. Pode-se perceber que o poder de redução da substância antioxidante aumenta com o aumento da concentração, e quanto maior a concentração, maior a absorvância e, portanto, maior a capacidade antioxidante da amostra.

A Figura 39 apresenta a atividade antioxidante dos compostos com relação à concentração empregada pelas metodologias abordadas, revelando de modo geral o efeito

dose-dependente por meio das inclinações das retas. Essa figura representa uma síntese das regressões realizadas nas metodologias.

Figura 39 – Atividade antioxidante dos compostos *versus* concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) pelas diferentes metodologias estudadas.



Legenda: — Inclinação referente ao controle positivo.

Fonte: Do autor (2018).

Ao analisar a Figura 39, pode-se verificar visualmente no gráfico e em valor numérico no Apêndice A que há retas com maior inclinação que a do controle, o que significa que há compostos que foram mais ativos que o mesmo diante da metodologia abordada. Compostos com atividade antioxidante próximo a zero não apresentaram inclinação da reta, assim como aqueles que possuem baixa atividade mostraram inclinação mínima. Assim, os compostos atuam de forma dose-dependente, em que se pode observar que nas maiores concentrações há maior inclinação da reta, indicando maior potencial antioxidante.

Diversas técnicas têm sido utilizadas para determinar a atividade antioxidante *in vitro*, de forma a permitir uma rápida seleção de substâncias ou misturas potencialmente interessantes na prevenção de doenças crônico-degenerativas. Diante disso, os resultados acima sustentam a importância de se realizar testes antioxidantes por diferentes metodologias, visto que métodos diferentes fornecem resultados diferentes. Pode-se inferir que a diferença expressa entre os testes seja decorrente de fatores, como a estrutura física do sistema, a natureza do substrato para oxidação, bem como a interação dos compostos com o meio reacional entre outros. Portanto, devido aos diversos tipos de radicais e aos diversos sítios de ação, dificilmente haverá um único método capaz de representar de forma segura e precisa a verdadeira atividade antioxidante de uma substância.

4.2 Atividade antitumoral

Realizou-se uma varredura (*screening*) das moléculas na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 40).

Figura 40 - Viabilidade celular (%) determinada por ensaio colorimétrico com resazurina em culturas de células tratadas por 48h com os diferentes compostos a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. (Continua)

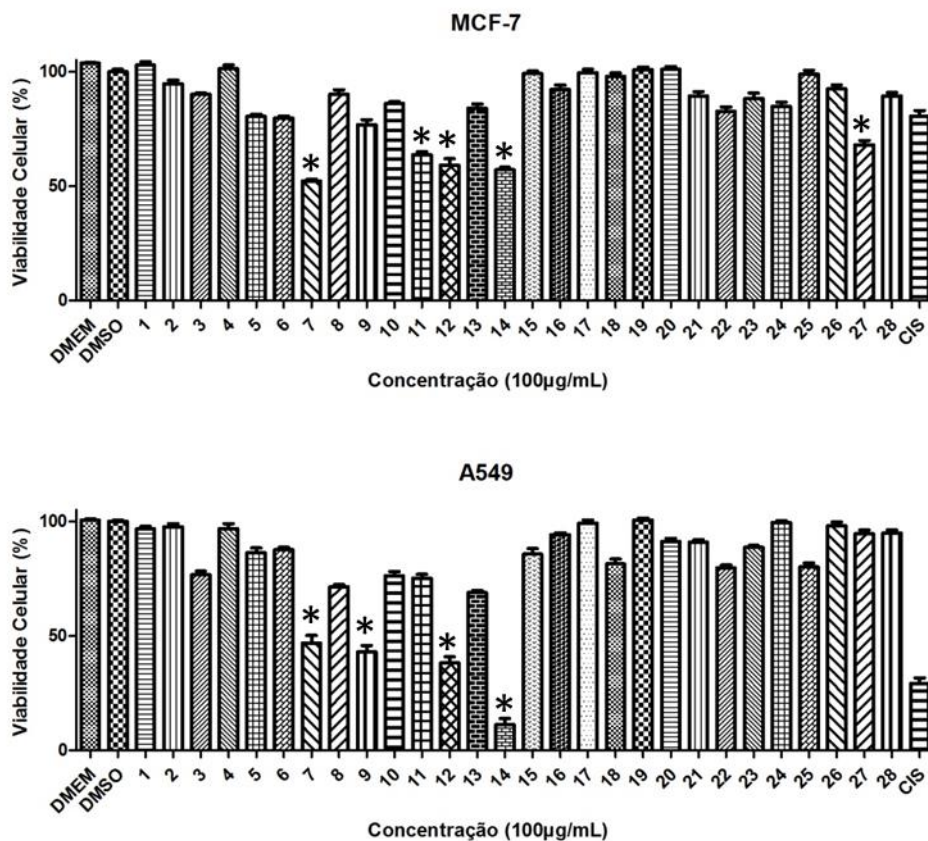
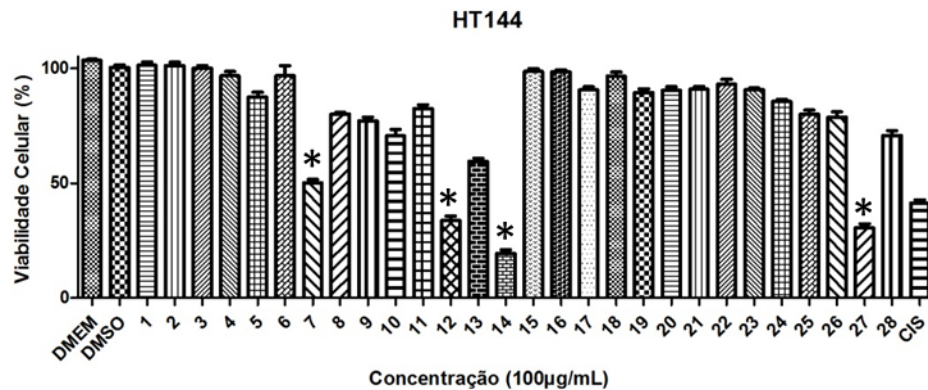


Figura 40 - Viabilidade celular (%) determinada por ensaio colorimétrico com resazurina em culturas de células tratadas por 48h com os diferentes compostos a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. (Conclusão)



Legenda: DMEM – sem tratamento; DMSO – dimetilsulfóxido; 1 – β -pineno; 2 – Metileugenol; 3 – *trans*-cariofileno; 4 – 1,8-cineol; 5 – Geraniol; 6 – α -pineno; 7 – Carvacrol; 8 – Borneol; 9 – α -bisabolol; 10 – Linalol; 11 – Limoneno; 12 – Timol; 13 – 4-Alilanisol; 14 – Citral; 15 – Mirceno; 16 – *p*-cimeno; 17 – β -citronelol; 18 – Mentol; 19 – Carvona; 20 – Citronelal; 21 – *trans*-anetol; 22 – Cânfora; 23 – Cineol; 24 – α -terpineol; 25 – Precoceno; 26 – *p*-anisaldeído; 27 – Eugenol; 28 – *trans*-farnesol; CIS – cisplatina.

Fonte: Do autor (2018).

A linhagem celular MCF-7 representa um dos tipos de câncer mais frequentes nas mulheres, o câncer de mama. Devido ao seu grande impacto sobre a população, essa doença representa um problema crítico de saúde pública que requer pesquisas adicionais a nível molecular, para definir seu prognóstico e tratamento específico. Dessa forma, faz-se mister realizar pesquisas com este intuito e isso envolve diversas linhagens celulares, pois podem ser empregadas como modelos *in vitro* na pesquisa sobre câncer (COMÇA; CIMPEAN; RAICA, 2015). Os compostos carvacrol (7), limoneno (11), timol (13), citral (14) e eugenol (27) foram os mais ativos sobre essa linhagem.

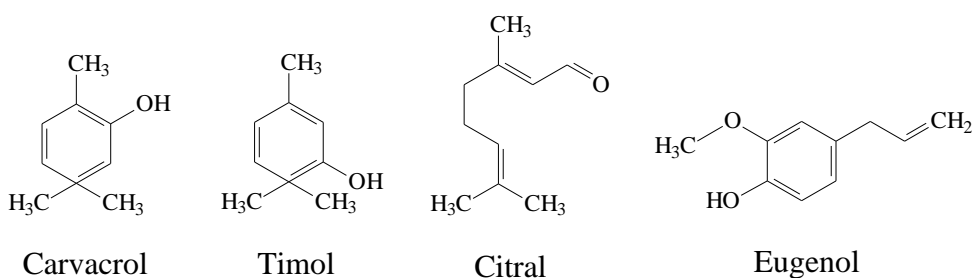
O modelo de células A549 é responsável por cerca de 80% de todos os tipos de câncer de pulmão diagnosticados. O bloqueio do crescimento das células cancerígenas é um esforço contínuo no tratamento do câncer. Assim, uma redução no crescimento dessas células e/ou indução da morte celular são os principais meios para inibir o desenvolvimento do tumor (YIN et al., 2004). Os constituintes carvacrol (7), α -bisabolol (9), timol (13), citral (14) inibiram em mais de 50% a taxa de células viáveis, destacando-se o citral, com capacidade de reduzir em mais de 80% a viabilidade celular.

O melanoma (HT144) é um dos tipos menos comuns de câncer de pele, mas, ainda assim, é responsável por cerca de 75% das mortes relacionadas a esse tipo de câncer. Os produtos naturais são reconhecidos como fonte de fármacos e algumas plantas e compostos

isolados de plantas são identificados como substâncias com potencial antitumoral (SU et al., 2009). Os compostos mais ativos sobre essa linhagem no presente trabalho foram o carvacrol (7), timol (13), citral (14) e eugenol (27), com reduções que variaram em torno de 50% a 80% da viabilidade celular.

De modo geral, pode-se observar pela análise da Figura 40 que os compostos carvacrol (7), timol (12), citral (14) e eugenol (27), representados na Figura 41, apresentaram maior potencial em reduzir a taxa de viabilidade celular entre as diferentes linhagens celulares testadas.

Figura 41 – Estruturas químicas dos compostos mais ativos contra linhagens celulares derivadas de tumores humanos (MCF-7, HT-144 e A549).



Fonte: Do autor (2018).

Os isômeros timol e carvacrol são monoterpenos fenólicos encontrados em muitas plantas aromáticas, incluindo tomilho e orégano e são largamente relatados na literatura devido à variedade de propriedades biológicas que apresentam. Adicionalmente, esses compostos também são descritos por possuir potencial antitumoral e diversos estudos relatam que estes isômeros inibem a proliferação celular e induzem à apoptose em células cancerígenas, sendo promissores na busca por agentes antitumorais de origem natural. Dados da literatura indicam que o timol pode exibir efeito protetor em concentrações menores; porém, em elevadas concentrações, é capaz de induzir o influxo de Ca²⁺ e a redução da viabilidade de células do glioma e melanoma (FAN, et al., 2015; HSU et al., 2011; KANG et al., 2016; LI et al., 2017; SATOOKA; KUBO, 2012; SHETTIGAR et al., 2015; YIN et al., 2012).

De maneira semelhante, diferentes atividades farmacológicas têm sido atribuídas ao eugenol, presente no óleo essencial de cravo-da-índia e pertencente à classe dos fenilpropanoides. Diversos autores mencionam que o eugenol exibe atividades

antiproliferativa e citotóxica em várias linhagens celulares. Jaafari e colaboradores (2012), investigando o mecanismo molecular envolvido na atividade citotóxica de constituintes de óleos essenciais, analisaram o efeito desses compostos, empregando a linhagem K-562 (eritroleucêmica) leucemia como alvo. Os autores não observaram efeito do eugenol na propagação do ciclo celular dessa linhagem. Por outro lado, a combinação de baixas doses de eugenol com drogas comumente já empregadas em processos quimioterápicos, como a Cisplatina, por exemplo, revelou efeito sinérgico, o que permite reduzir a toxicidade dos antitumorais convencionais, pela diminuição de sua dose. Dessa forma, com o intuito de diminuir a toxicidade dos quimioterápicos até então empregados, os efeitos causados pelo sinergismo entre os constituintes de óleos essenciais e o fármaco convencional devem ser mais bem estudados, visto que são aspectos promissores.

Koziol e colaboradores (2014) mostraram que os terpenos insaturados são capazes de capturar espécies ativas de oxigênio *in vivo* para formar epóxidos intermediários e hidroperóxidos, que podem danificar o DNA, as proteínas e outras biomoléculas. Para eles, esta propriedade explica o motivo pelo qual os monoterpenos encontrados em plantas de uso alimentar atuam efetivamente no nível celular em quimioprevenção de diferentes tipos de câncer em modelos animais e em ensaios clínicos em humanos.

O monoterpeno acíclico citral formado por uma mistura isomérica dos compostos geranial e neral, é encontrado em uma variedade de plantas, especialmente no óleo essencial de capim-limão, extraído de *Cymbopogon citratus*. Patel, Thakkar e Patel (2015) argumentam em seu estudo que, ao aumentarem a dose e o tempo do composto citral sobre as linhagens de câncer de mama testadas (MCF 7 e MDA MB 231), o mesmo inibiu de forma dependente a morte celular de células de câncer de mama, mas não observaram esse efeito em células normais. Ressalta-se a importância de estudos como esse, pois a busca por compostos quimioterápicos que não sejam citotóxicos às células normais é crescente e de extrema importância, a fim de amenizar os efeitos colaterais relatados por pacientes oncológicos. Esse aspecto acerca do efeito do citral em células cancerígenas também foi observado por Sanches e colaboradores (2017), que acreditam que o efeito citotóxico do citral em células do melanoma é devido à indução do estresse oxidativo, responsável por lesões no DNA e indução de apoptose.

Salienta-se que os maiores desafios dos agentes quimioterápicos empregados no tratamento do câncer são a resistência que provocam nas células tumorais e a destruição das células normais. A desregulação no controle do ciclo celular é um aspecto fundamental no desenvolvimento do câncer. As células normais se proliferam em resposta ao

desenvolvimento da célula ou a sinais presentes na mitose que indicam um requisito para o crescimento do tecido, ao passo que a proliferação das células cancerosas acontece de forma descontrolada. Isso indica que as células cancerosas proliferam devido a presença de defeitos de sinalização internos e/ou externos, fazendo com que geralmente as células tumorais sejam menos especializadas nas suas funções do que as suas correspondentes normais. Assim, à medida que as células tumorais vão substituindo as normais, os tecidos invadidos vão perdendo suas funções (GUPTE et al., 2013; SOARES et al., 2013).

Após a seleção das moléculas mais ativas, um novo ensaio de viabilidade foi realizado com a finalidade de obter uma curva dose-resposta. Os resultados obtidos nesse passo confirmam aqueles observados na triagem inicial e mostram que os compostos carvacrol (7), timol (12), citral (14) e eugenol (27) apresentaram expressiva atividade antiproliferativa, sendo seus efeitos dependentes da concentração utilizada (Figura 42). Após um período de 48 horas de tratamento com diferentes concentrações dos constituintes, estimaram-se os níveis de IC_{50} (concentração necessária para inibir 50% da viabilidade celular).

Figura 42 – Viabilidade celular (%) determinada por ensaio colorimétrico com resazurina em culturas de células derivadas de tumores humanos tratadas com constituintes de óleos essenciais em diferentes concentrações por 48h. (Continua)

MCF – 7

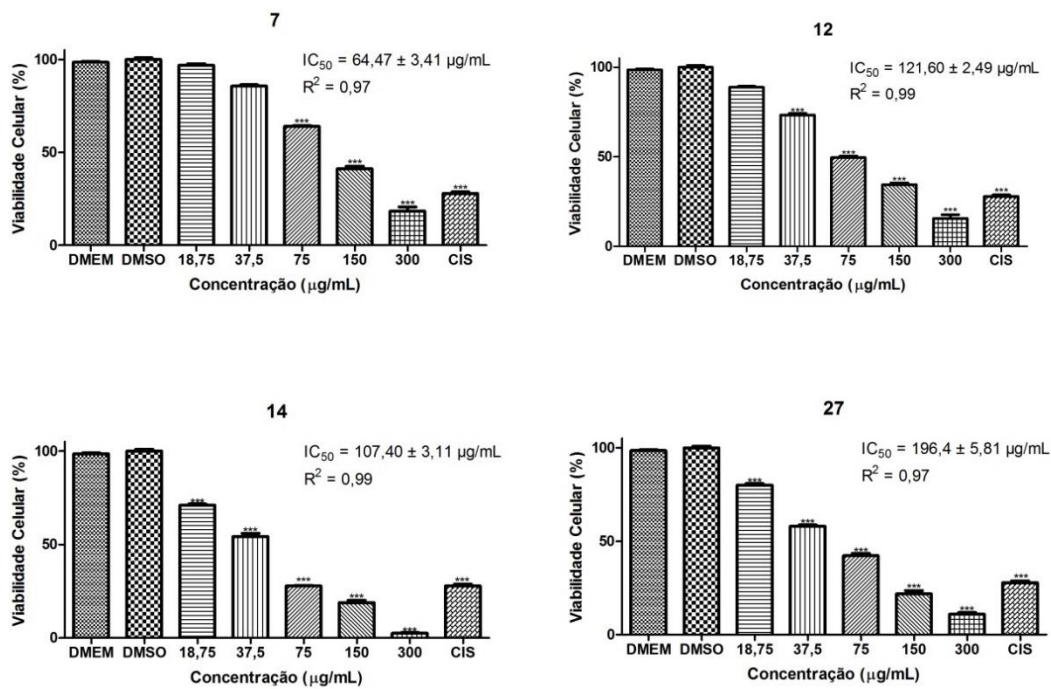
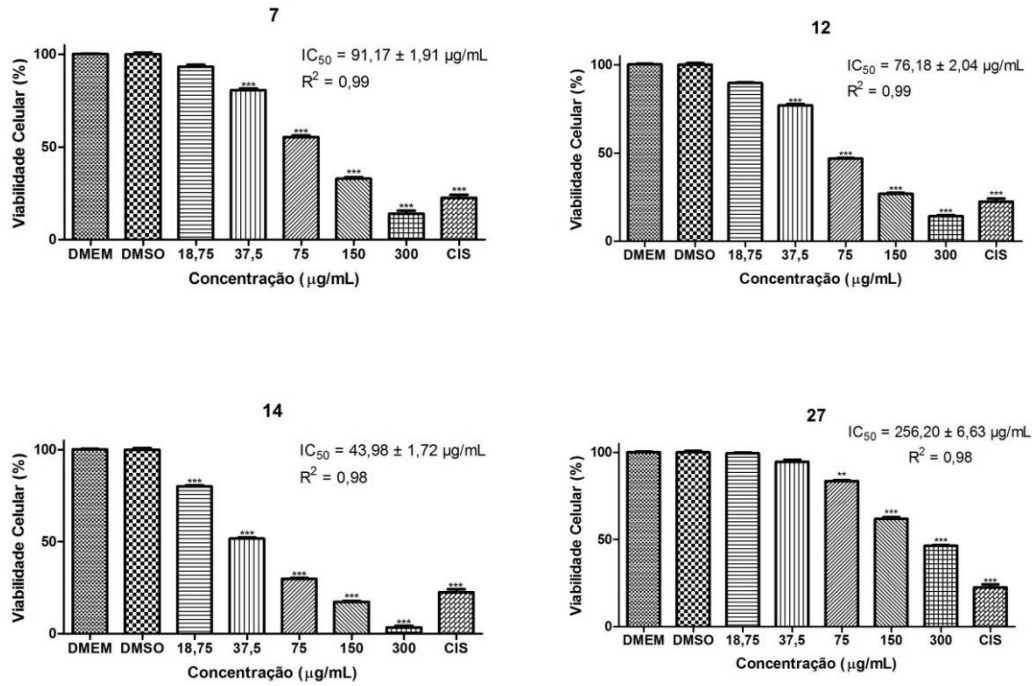
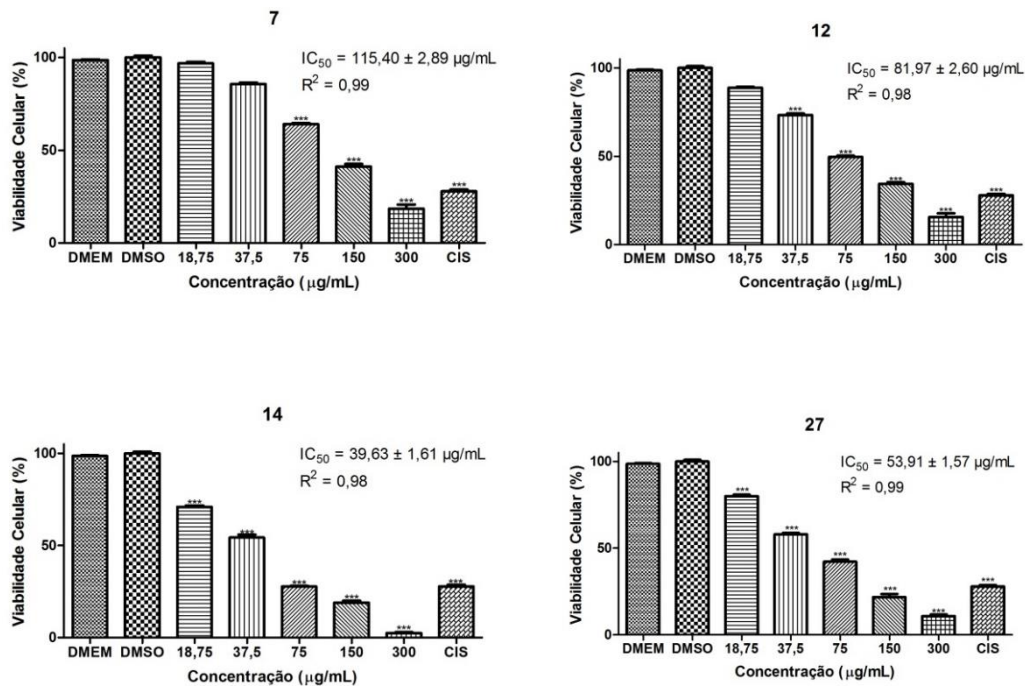


Figura 42 – Viabilidade celular (%) determinada por ensaio colorimétrico com resazurina em culturas de células derivadas de tumores humanos tratadas com constituintes de óleos essenciais em diferentes concentrações por 48h. (Conclusão)

A549



HT – 144



Legenda: DMEM – sem tratamento; DMSO – dimetilsulfóxido; Cis – cisplatina; 7 – Carvacrol; 12 – Timol; 14 – Citral; 27 – Eugenol.

Fonte: Do autor (2018).

Pode-se notar que os compostos apresentaram efeito dose-resposta, ao passo que, ao aumentar a concentração das substâncias, a proporção de células viáveis diminuiu entre as linhagens analisadas. O IC₅₀ do composto carvacrol sobre a linhagem MCF-7 foi de $64,47 \pm 3,41 \mu\text{g mL}^{-1}$, menor valor dentre os compostos selecionados. Para as linhagens A549 e HT-144, o composto citral revelou os menores valores de IC₅₀, sendo $43,98 \pm 1,72 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $39,63 \pm 1,61 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Além de mostrar maior potencial em reduzir a taxa de células viáveis entre essas culturas, apresentou na concentração de $75 \mu\text{g mL}^{-1}$ redução em torno de 75% da viabilidade celular, semelhante ao controle cisplatina, na concentração de $6 \mu\text{g mL}^{-1}$.

As células cancerígenas são caracterizadas por apresentar capacidade de sustentar a proliferação crônica. Nesse sentido, o estudo acerca do potencial antiproliferativo *in vitro* é a etapa inicial na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos contra o câncer, pois revela resultados rápidos e conclusivos, consumindo pequena quantidade de princípio ativo (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

O mecanismo exato do efeito desses constituintes de óleos essenciais sobre a proliferação de células tumorais ainda não está elucidado. Pode-se inferir que esteja relacionado à natureza lipofílica desses compostos, visto que são capazes de danificar a membrana celular ou alterar a permeabilidade da mesma. O estresse oxidativo é um dos principais fatores responsáveis pela toxicidade celular, destacando-se também inibições na síntese de ácido graxo, acúmulo de p53, indução de bloqueio no ciclo celular, inibição de enzimas cruciais na progressão do ciclo celular, entre outros. Além disso, diversos autores atribuem o potencial antitumoral dos óleos essenciais à sua composição, rica em monoterpenos e relatam que em certas dosagens esses compostos voláteis podem exibir efeitos semelhantes aos anestésicos locais. Eles podem interagir com as membranas celulares por meio de suas propriedades físico-químicas e formas moleculares e, desse modo, são capazes de influenciar as enzimas, transportadores, canais e receptores iônicos (AYDIN; TÜRKEZ; KELEŞ, 2014; GALI-MUHTASIB, 2006; GAUTAM; MANTHA; MITTAL, 2014; SOBRAL et al., 2014).

Adicionalmente, esses constituintes podem atuar inibindo ou modulando eventos que ocorrem durante ou após o desenvolvimento do tumor, tais como proliferação, angiogênese, invasão ou morte celular associada ou não à apoptose. Do mesmo modo, alguns desses compostos também exercem ação estimuladora em enzimas responsáveis pelo metabolismo de agentes mutagênicos ou eliminam rotas de estresse oxidativo, condições diretamente envolvidas na transformação celular. Ademais, diversos trabalhos evidenciam que

os constituintes presentes nos óleos essenciais são capazes de induzir bloqueio em uma das fases do ciclo celular (FERNANDES, 2015; LOPES; JÚNIOR; LEMOS, 2015). Com a finalidade de explorar o efeito do citral na proliferação das células de HT – 144, ensaios com o propósito de elucidar onde esse composto atua na progressão do ciclo celular foram realizados.

A frequência de células nas diferentes fases do ciclo celular foi determinada por citometria de fluxo. De acordo com os resultados, o composto analisado interfere na progressão do ciclo celular sobre as células da linhagem HT144 e os efeitos são dependentes da concentração utilizada.

Em culturas de HT144 tratadas por 48 horas com o citral a $40 \mu\text{g mL}^{-1}$, notou-se um aumento na população G0/G1, com concomitante diminuição na frequência de células nas fases S e G2/M, resultado não observado quando a linhagem foi tratada na concentração de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os dados indicam, portanto, que o composto citral induz bloqueio do ciclo celular na transição G1/S (Figura 43). A Tabela 1 descreve a análise do efeito do citral na progressão do ciclo celular da linhagem HT144 por 48h. Entretanto, não houve aumento significativo na população de células na fase sub-G1, que representa uma população celular com DNA fragmentado, inferindo-se que não houve indução de morte celular causada pelo citral.

Figura 43 – Histogramas referentes ao efeito do citral (20 e $40 \mu\text{g mL}^{-1}$) na progressão do ciclo celular da linhagem HT144 por 48h (Continua).

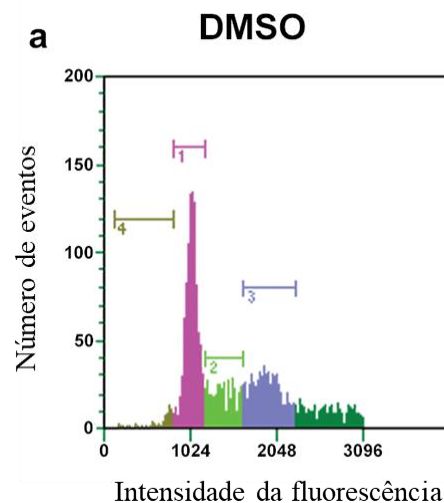
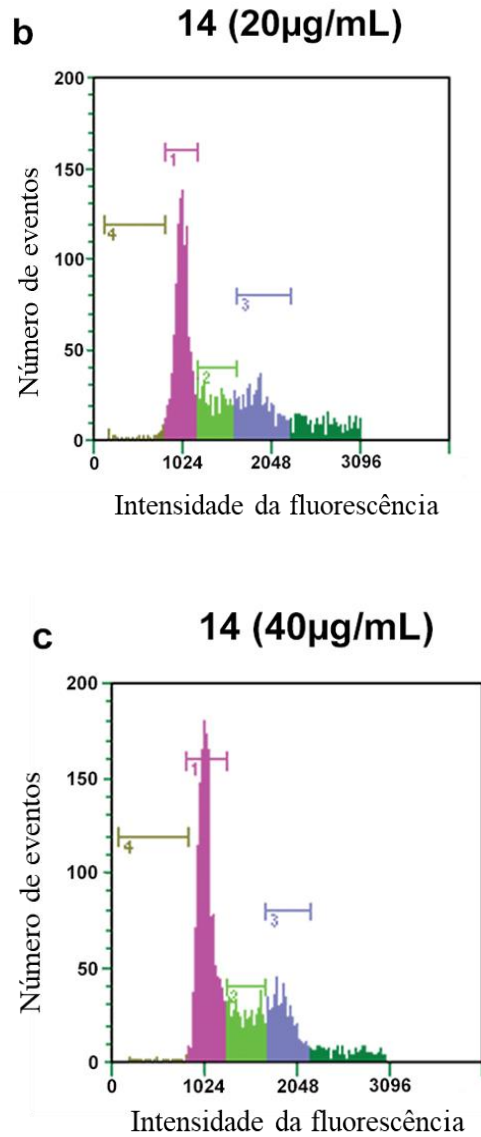


Figura 43 – Histogramas referentes ao efeito do citral (20 e 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$) na progressão do ciclo celular da linhagem HT144 por 48h. (Conclusão)



Legenda: Picos em rosa (1): Fase G0/G1. Picos em verde (2): Fase S. Picos em azul (3): Fase G2/M. Picos em marrom (4): Fase G0.

Tabela 1 - Análise do efeito do citral (20 e 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$) na progressão do ciclo celular da linhagem HT144 por 48h.

| Linhagem | Tratamento ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Fases do ciclo celular | | | |
|----------|---|------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | | SubG1 | G0/G1 | S | G2/M |
| HT144 | Controle | 1,16 \pm 0,37 | 48,11 \pm 0,61 | 20,93 \pm 0,42 | 29,80 \pm 0,28 |
| | 20 | 1,47 \pm 0,47 | 51,83 \pm 1,27 | 19,68 \pm 0,36 | 27,02 \pm 0,36 |
| | 40 | 0,89 \pm 0,12 | 60,39 \pm 0,74*** | 17,94 \pm 0,88*** | 20,77 \pm 0,36*** |

Fonte: Do autor (2018).

O ciclo celular pode ser entendido como uma sequência de eventos controlados que vão desde a formação da célula até sua divisão ou morte. O processo de divisão celular nos eucariontes compreende quatro fases: G1, S, G2 e M. As células quiescentes encontram-se em um estado denominado G0, no qual as células adultas maduras podem ficar por tempo indeterminado. Nesse estágio, as células permanecem metabolicamente ativas, mas não se dividem ou se dividem apenas quando estimuladas por sinais extracelulares, com a finalidade de renovação tecidual, após morte ou lesão celular. A fase G1 é considerada uma fase pré-sintética, na qual as células se preparam para iniciar a síntese de DNA. Esse período é caracterizado pela transcrição gênica e tradução, levando à síntese de proteínas necessárias para a síntese de DNA. A fase S compreende o período da duplicação do DNA celular. O período G2 é o intervalo entre o final da síntese e o início da mitose propriamente dita da célula em questão, sendo, por esse motivo, denominada fase pré-mitótica. Por fim, a duplicação celular acontece na fase M, também chamada de mitose, em que os componentes celulares são divididos (FERRAZ; SANTOS; DISCACCIATI, 2012).

Os resultados de viabilidade com determinação do IC50 e a análise de progressão do ciclo celular forneceram dados importantes para o delineamento de novas abordagens experimentais que podem ser realizadas para melhor entender o efeito antiproliferativo do citral, previamente observados sobre a linhagem HT144.

Em suma, uma única célula cancerosa pode se proliferar, formando uma colônia, que é a base da incidência do tumor, e possível ocorrência de metástase. O bloqueio do ciclo celular, bem como a inibição da proliferação celular e a indução da apoptose celular, são as principais abordagens para tratamento de câncer. Nos dias atuais, além dos procedimentos cirúrgicos, a quimioterapia e a radioterapia são as maiores opções para o tratamento do câncer, embora os danos causados pelos efeitos colaterais sejam severos. Nesse sentido, a identificação de drogas antitumorais provenientes de produtos naturais com alta eficiência e baixa toxicidade é um aspecto relevante no desenvolvimento de fármacos antitumorais (WU et al., 2016).

4.3 Efeito inibitório dos constituintes de óleos essenciais sobre fungos do gênero *Aspergillus*

Os valores referentes às concentrações mínimas inibitórias (CMIs) dos compostos *p*-cimeno, eugenol, carvacrol, citral, *trans*-cariofileno e *trans*-farnesol sobre os fungos *A.*

carbonarius, *A. flavus*, *A. ochraceus* e *A. niger*, utilizando-se a metodologia de difusão em disco, estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Concentração mínima inibitória dos compostos *p*-cimeno, eugenol, carvacrol, citral, *trans*-cariofileno e *trans*-farnesol sobre fungos do gênero *Aspergillus*.

| Fungo | CMI ($\mu\text{L mL}^{-1}$) | | | | | | | Flu |
|-----------------------|-------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-----|
| | <i>p</i> - cim | Eug | Car | Cit | t-car | t-far | DMSO | |
| <i>A. carbonarius</i> | 125 | 15,62 | 15,62 | 31,25 | 250 | 31,25 | NI | 2 |
| <i>A. flavus</i> | 125 | 15,62 | 15,62 | 31,25 | 250 | 125 | NI | 2 |
| <i>A. ochraceus</i> | 125 | 7,81 | 7,81 | 15,62 | 250 | 31,25 | NI | 2 |
| <i>A. niger</i> | 125 | 7,81 | 7,81 | 7,81 | 250 | 125 | NI | 2 |

Legenda: *p*-cim – *p*-cimeno; Eug – Eugenol; Car – Carvacrol; Cit – Citral; t-car – *trans*-cariofileno; t-far – *trans*-farnesol; DMSO – dimetilsulfóxido; NI – Não inibiu; Flu. – Fluodioxonil.

Fonte: Do autor (2018).

A atividade antifúngica dos derivados terpênicos e fenilpropanóides que constituem os óleos essenciais dependem de sua estrutura química. Os resultados encontrados evidenciam que os compostos eugenol e carvacrol apresentam maior potencial de inibição sobre os fungos analisados. Além disso, os fungos *A. ochraceus* e *A. niger* mostraram-se mais sensíveis frente aos constituintes avaliados.

Vieira e colaboradores (2014) apontam que o caráter lipofílico do esqueleto carbônico, bem como o caráter hidrofílico de seus grupos funcionais, são aspectos relevantes na determinação do potencial antimicrobiano de constituintes de óleos essenciais. Dessa forma, a atividade antimicrobiana segue a seguinte ordem: fenóis > aldeídos > cetonas > álcoois > éteres > hidrocarbonetos.

Essa relação entre a atividade antimicrobiana e o grupo funcional presente no composto vai de encontro com os resultados encontrados neste trabalho. Assim, o eugenol, um composto fenólico e o carvacrol, um monoterpene com características fenólicas, apresentaram melhor eficácia na inibição dos micro-organismos, mostrando atividade nas menores concentrações testadas. Ainda nessa mesma linha de raciocínio, tem-se o citral, que apresenta o grupo funcional aldeído em sua estrutura química, e portanto, apresenta maior atividade antifúngica que o *trans*-farnesol, que é um álcool. Por fim, os compostos *p*-cimeno e *trans*-cariofileno apresentaram menor capacidade em inibir o crescimento dos fungos, uma vez que são hidrocarbonetos. Contudo, infere-se que compostos com cadeia carbônica menor apresentem maior facilidade em atravessar a camada lipídica dos fungos. Assim, a maior

eficácia do *p*-cimeno, quando comparado ao *trans*-cariofileno, pode ser devido ao fato de o primeiro ser monoterpeno (10 C), ao passo que o segundo é sesquiterpeno (15 C).

Ao analisar a composição celular dos fungos, pelo menos seis mecanismos antifúngicos diferentes podem ser sugeridos. Esses mecanismos baseiam-se na inibição da formação da parede celular, ruptura da membrana celular, disfunção da mitocôndria dos fungos, inibição da divisão celular, inibição da síntese de DNA/RNA e de proteínas e inibição da bomba de prótons (LAGROUH; DAKKA; BAKRI, 2017).

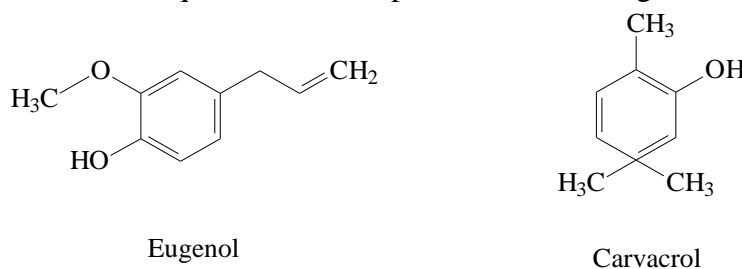
Como a parede celular dos fungos consiste principalmente em β -glucanos e quitina, e uma vez que a síntese desses compostos é inibida, rompe-se a integridade da parede celular. Em relação à membrana celular, o ergosterol é um esteroide essencial para o desempenho da membrana e quando associados a drogas antifúngicas ou a inibidores de sua biossíntese, irá ocorrer perturbação na integridade da membrana celular. Levando em consideração a função das mitocôndrias, se o transporte mitocondrial de elétrons for inibido, acarretará redução no potencial de membrana. Esse bloqueio pode ocorrer por meio da inibição das bombas de prótons na cadeia respiratória, seguida da redução na produção de ATP e subsequente morte celular. A inibição da divisão celular pode ocorrer por intermédio da inibição da polimerização de microtúbulos e, por conseguinte, bloqueio da formação do fuso mitótico. Em referência à inibição da síntese de DNA/RNA e proteínas, essa ocorre quando o agente antifúngico penetra na célula e envolve-se com o RNA, induzindo a inibições na síntese de RNA e na transcrição de DNA, sendo essas inibições alvos antifúngicos conhecidos. Por fim, o bombeamento de agentes antifúngicos do meio intracelular para o meio extracelular, isto é, seu efluxo ativo, ocasiona resistência fúngica a determinados antifúngicos e, dessa forma, a inibição da bomba de efluxo gera redução da resistência dos fármacos (LAGROUH; DAKKA; BAKRI, 2017; SUN; DENG; YAN, 2014; ZORE et al., 2011).

A membrana plasmática desempenha uma função essencial, uma vez que está relacionada à manutenção de um ambiente homeostático, troca de substâncias, transferência de energia e informação nas células fúngicas, a fim de mantê-las vivas e saudáveis. Além disso, as mitocôndrias também são de fundamental importância, visto que são responsáveis pela produção de energia, homeostase de pH, equilíbrio redox, tampão de cálcio, regulação do nível de segundos mensageiros e regulação da apoptose (TIAN et al., 2012).

Abbaszadeh e colaboradores (2014) salientaram que o mecanismo de ação dos compostos fenólicos ainda não é muito bem elucidado, embora danos na membrana e na parede celular bem como deformações morfológicas com deterioração dos conídios e hifas sejam abordados. Oliveira e colaboradores (2016) avaliaram o potencial antifúngico do óleo

essencial de *Ocimum gratissimum*, que possui o eugenol como componente majoritário (51,84%). Os autores observaram que o OE promoveu alteração na permeabilidade da membrana celular, sendo esse um dos mecanismos de ação mais prováveis dos OE's. Além do mais, relatam que o potencial antifúngico elevado dos compostos fenólicos eugenol e carvacrol (Figura 44) pode ser explicado devido à acidez do grupo hidroxila, capaz de formar ligação de hidrogênio com o centro ativo das enzimas dos micro-organismos, prevenindo a ação enzimática. Outro aspecto relacionado com a atividade antifúngica é destacado por Pisoschi e colaboradores (2017) em relação à influência da estrutura fenólica na atividade antimicrobiana, dado que compostos que são capazes de promover a deslocalização dos pares de elétrons podem atuar como trocadores de prótons, diminuindo o gradiente de pH na membrana citoplasmática. Isso causa a decadência da força motriz dos prótons, redução da síntese de ATP e, subsequentemente, morte celular.

Figura 44 – Estrutura química dos compostos fenólicos eugenol e carvacrol.



Fonte: Do autor (2018).

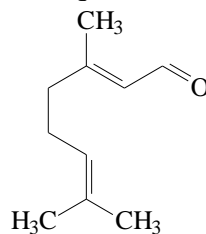
Considerando a natureza lipofílica desses compostos presentes em diversos óleos essenciais, pode-se inferir que eles atuam entre as cadeias de ácido graxo da bicamada lipídica, interrompendo sua fluidez e permeabilidade. Para Wang e colaboradores (2015) e Marchese e colaboradores (2017), esses compostos podem se acumular na membrana celular, desintegrando-a e tornando-a altamente permeável a íons que possam ser responsáveis pela atividade antifúngica. De fato, manter a homeostasia dos íons é fundamental para manter o estado de energia da célula, bem como processos acoplados à membrana e dependentes de energia, como o transporte de soluto, regulação do metabolismo, controle da pressão e mobilidade.

Os monoterpenos que apresentam o grupo funcional aldólico em sua estrutura são conhecidos por possuírem atividade antimicrobiana. Dessa maneira, tem sido proposto que um grupo aldeído conjugado com uma dupla ligação carbono-carbono (C=C) forma um arranjo altamente eletronegativo e infere-se que um aumento na eletronegatividade resulta em

um aumento no potencial antimicrobiano. Esses compostos eletronegativos podem interferir no processo biológico envolvendo a transferência de elétrons e, então, inibir o crescimento do micro-organismo (BHATTI et al., 2014).

Ressalta-se a contribuição dos autores Tao, Ouyang e Jia (2014), posto que eles investigaram a atividade antifúngica, juntamente com o mecanismo de ação do composto citral (Figura 45) sobre um dos principais patógenos de pós-colheita do gênero *Citrus*, *Penicillium italicum*. Nessa pesquisa, salientam que o citral alterou a morfologia das hifas de *P. italicum*, causando perda do citoplasma e distorção do micélio. Além disso, o composto agiu de modo dose dependente com a membrana, uma vez que o aumento na concentração de citral impactou em aumento na permeabilidade da membrana, evidenciado pela liberação de constituintes celulares, pH extracelular e vazamento de íons. Destacaram também que o citral pode induzir a uma diminuição dos teores de lipídios e de ergosterol presentes na membrana de *P. italicum*, indicando a ruptura da integridade da mesma. Infere-se com esses resultados que a atividade antifúngica do citral sobre *P. italicum* pode ser atribuída a interrupção da integridade da membrana celular, bem como ao aumento da permeabilidade da mesma.

Figura 45 - Estrutura química do composto citral.



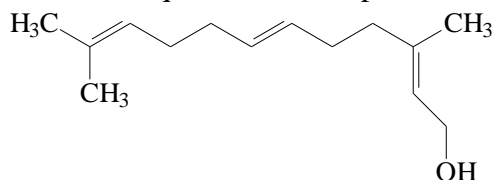
Fonte: Do autor (2018).

De modo similar, Leite e colaboradores (2014) analisaram a atividade antifúngica e o possível mecanismo de ação do citral sobre *Candida albicans*. Os autores notaram que o composto não atua na inibição da síntese da parede celular, mas, sim, na membrana celular, afetando sua estrutura, bloqueando sua síntese e induzindo à morte celular, pois inibe a germinação de esporos, a proliferação e a respiração celular.

O potencial antifúngico observado para o *trans*-farnesol (Figura 46) pode ser atribuído à sua natureza hidrofóbica, visto que esse apresenta uma cadeia com 15 átomos de carbono e uma pequena parte hidrofílica, devido à presença da hidroxila. Assim, possui alta afinidade pela membrana da célula fúngica, sendo capaz de acumular-se na mesma, causando expansão e comprometendo sua integridade devido à liberação do material intracelular (D'AMATO et al., 2018). Bhatti e colaboradores (2014) acreditam que a porção alcoólica presente na

molécula seja fator determinante para sua atividade antifúngica, sendo prioritária em relação à estrutura cíclica ou acíclica do composto.

Figura 46 - Estrutura química do composto *trans*-farnesol.

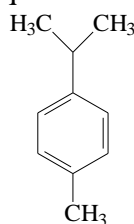


Fonte: Do autor (2018).

Apesar da atividade antifúngica indicada pelo *trans*-farnesol, ela não é tão expressiva quanto aquela encontrada para os compostos carvacrol e eugenol. Embora o *trans*-farnesol tenha um grupamento hidroxil, ele não apresenta um sistema de deslocalização de elétrons, e por conseguinte, o grupo hidroxil não possui tendência em liberar o próton.

Os monoterpenos não representam um grupo de constituintes com alta atividade antifúngica e diversos estudos demonstram que são ineficientes, quando testados sozinhos (GOMES et al., 2014; HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012; KORDALI et al., 2008; MARCHESE et al., 2017). O *p*-cimeno (Figura 47), precursor do carvacrol, atua como uma “impureza substitutiva” na membrana, uma vez que substitui as moléculas lipídicas, causando variações na temperatura de transição e nos valores de entalpia. Em virtude da afinidade do *p*-cimeno com a membrana, esse perturba a mesma parcialmente, causando expansão e, conseqüentemente, afetando o potencial de membrana de células intactas. Devido ao fato de ser um monoterpeno com um anel benzênico sem a presença de nenhum grupo funcional em sua cadeia carbônica, o *p*-cimeno não afeta a permeabilidade da membrana, mas altera outros parâmetros físico-químicos, como temperatura e entalpia (CRISTANI et al., 2007; HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012).

Figura 47- Estrutura química do composto *p*-cimeno.

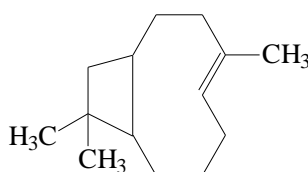


Fonte: Do autor (2018).

Ultee, Bennik e Moezelaar (2002) também comentaram que, na presença do *p*-cimeno, o potencial de membrana diminui principalmente pelo extravasamento de outros íons que não sejam o H⁺, por exemplo K⁺, porque somente um pequeno efeito no pH foi observado. Essa baixa variação no pH pode explicar o motivo pelo qual a síntese de ATP não foi afetada pelo *p*-cimeno. Os autores ressaltam que tanto o carvacrol quanto o *p*-cimeno possuem um efeito na integridade da membrana; porém, a desestabilização da membrana não explica a alta atividade antimicrobiana do carvacrol quando comparada com o *p*-cimeno. Assim, inferem que outro fator esteja envolvido, sendo, portanto, a presença da hidroxila na molécula de carvacrol. Constataram que o *p*-cimeno atua sinergisticamente com o carvacrol causando a expansão da membrana; entretanto, a atividade antimicrobiana do carvacrol é causada pela diminuição do pH como resultado de um grupo hidroxil e um sistema de elétrons deslocalizados.

O sesquiterpeno bicíclico *trans*-cariofileno (Figura 48) foi o composto que apresentou menor eficácia no combate aos fungos estudados. Pode-se inferir que esse resultado seja devido à ausência de hidroxila em sua estrutura bem como à deficiência de duplas conjugadas. Além disso, por apresentar uma estrutura bicíclica com 15 átomos de carbono, espera-se que seja mais difícil interagir com a membrana celular e romper sua integridade.

Figura 48 - Estrutura química do composto *trans*-cariofileno.



Fonte: Do autor (2018).

Diversos trabalhos citam as associações entre a atividade antifúngica e a inibição da biossíntese do ergosterol, bem como a ruptura da integridade da membrana. De modo similar, outros autores argumentam que o potencial antifúngico dos óleos essenciais e seus componentes esteja relacionado aos danos causados na membrana citoplasmática e subsequente vazamento de compostos intracelulares (DNA), bem como a interrupção do sistema de endomembrana de células fúngicas, isto é, inibição da síntese do ergosterol e das atividades da malato desidrogenase, ATPase mitocondrial, e succinato desidrogenase estão relacionadas ao potencial antifúngico (AHMAD et al., 2011; BRANDÃO, 2017; HU et al.,

2017; SILVA et al., 2011b). Dessa forma, é complicado prever o quão susceptível determinado micro-organismo é perante certo composto, assim como seu modo de ação e sua interação com o ambiente circundante.

4.4 Efeito dos compostos eugenol, carvacrol e citral sobre o crescimento micelial dos fungos *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus niger* em diferentes temperaturas

Diante dos resultados obtidos no teste anterior, decidiu-se avaliar o efeito dos compostos eugenol, carvacrol e citral sobre o crescimento micelial dos fungos *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus niger* em diferentes temperaturas. Os valores do diâmetro médio do crescimento micelial do fungos *A. carbonarius* sobre os compostos analisados estão representados nas Tabelas 3, 4 e 5.

Tabela 3 – Diâmetro médio do crescimento micelial do fungo *Aspergillus carbonarius* sobre o composto carvacrol.

| Concentração ($\mu\text{L mL}^{-1}$) | Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) | | | Inibição micelial (%) | | |
|---|------------------------------------|----------|----------|-----------------------|---------|---------|
| | 15 | 20 | 25 | 15 | 20 | 25 |
| 1,95 | 3,417 Ab | 5,633 Aa | 6,183 Ba | 0,000 | 17,368 | 27,259 |
| 3,91 | 1,500 Bb | 5,133 Aa | 5,183 Ba | 14,286 | 24,703 | 39,023 |
| 7,81 | 0,000 Cb | 1,900 Ba | 0,000 Cb | 100,000 | 72,128 | 100,000 |
| 15,62 | 0,000 Ca | 0,000 Ca | 0,000 Ca | 100,000 | 100,000 | 100,000 |
| Testemunha | 1,750 Bc | 6,817 Ab | 8,500 Aa | 0,000 | 0,000 | 0,000 |

Legenda: As médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e pela mesma letra maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2018).

Tabela 4 – Diâmetro médio do crescimento micelial do fungo *Aspergillus carbonarius* sobre o composto citral.

| Concentração ($\mu\text{L mL}^{-1}$) | Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) | | | Inibição micelial (%) | | |
|---|------------------------------------|----------|----------|-----------------------|---------|---------|
| | 15 | 20 | 25 | 15 | 20 | 25 |
| 3,91 | 0,000 Bc | 3,917 Bb | 8,667 Aa | 100,000 | 42,541 | 0,000 |
| 7,81 | 0,000 Bb | 0,000 Cb | 4,133 Ba | 100,000 | 100,000 | 51,376 |
| 15,62 | 0,000 Ba | 0,000 Ca | 0,000 Ca | 100,000 | 100,000 | 100,000 |
| 31,25 | 0,000 Ba | 0,000 Ca | 0,000 Ca | 100,000 | 100,000 | 100,000 |
| Testemunha | 1,750 Ac | 6,817 Ab | 8,500 Aa | 0,000 | 0,000 | 0,000 |

Legenda: As médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e pela mesma letra maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2018).

Tabela 5 – Diâmetro médio do crescimento micelial do fungo *Aspergillus carbonarius* sobre o composto eugenol.

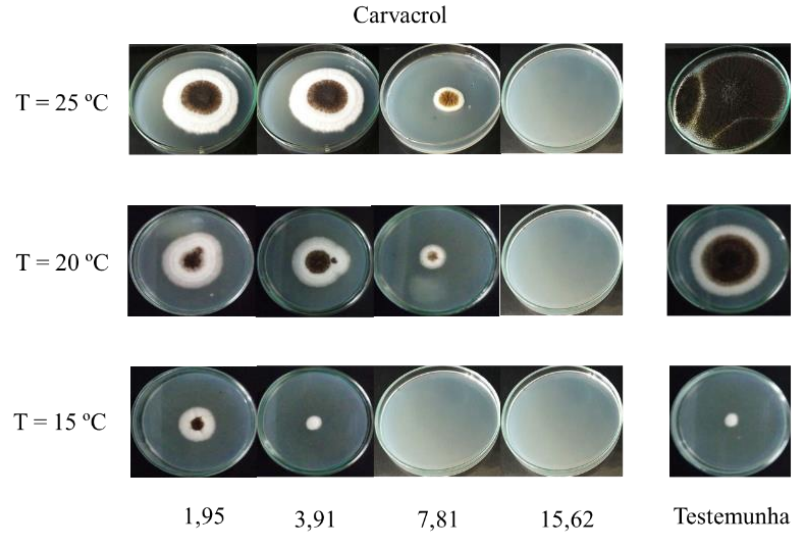
| Concentração ($\mu\text{L mL}^{-1}$) | Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) | | | Inibição micelial (%) | | |
|---|------------------------------------|----------|----------|-----------------------|---------|---------|
| | 15 | 20 | 25 | 15 | 20 | 25 |
| 1,95 | 2,100 Ac | 6,583 Ab | 9,000 Aa | 0,000 | 3,433 | 0,000 |
| 3,91 | 1,067 Ab | 6,400 Aa | 6,483 Ba | 39,029 | 6,117 | 23,729 |
| 7,81 | 0,000 Bc | 5,683 Aa | 2,583 Cb | 100,000 | 16,635 | 69,612 |
| 15,62 | 0,000 Ba | 0,000 Ba | 0,000 Da | 100,000 | 100,000 | 100,000 |
| Testemunha | 1,750 Ac | 6,817 Ab | 8,500 Aa | 0,000 | 0,000 | 0,000 |

Legenda: As médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e pela mesma letra maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2018).

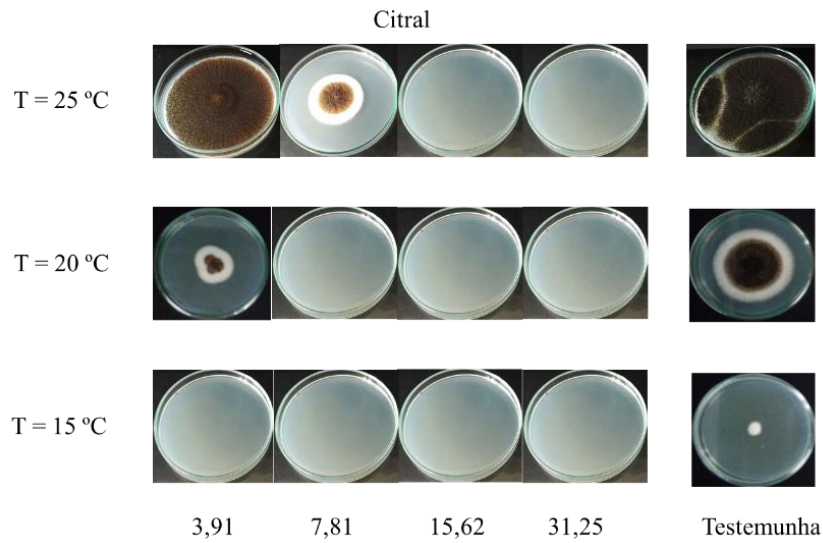
Os compostos carvacrol e citral apresentaram inibição total do crescimento micelial de *A. carbonarius* a partir das concentrações de 7,81 e 15,625 $\mu\text{L mL}^{-1}$, respectivamente, na temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}$, uma concentração abaixo daquela realizada no teste preliminar para CMI. O eugenol respondeu como esperado, apresentando inibição total do crescimento micelial a partir da concentração de 15,62 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Além disso, constatou-se diferença significativa em relação ao crescimento micelial nas temperaturas de 25, 20 e 15 $^{\circ}\text{C}$, sendo a temperatura de 15 $^{\circ}\text{C}$ menos eficaz para o crescimento do fungo e as temperaturas de 20 $^{\circ}\text{C}$ e 25 $^{\circ}\text{C}$ as mais propícias para o seu desenvolvimento. Também foi possível observar que o composto carvacrol, em sua menor concentração (1,95 $\mu\text{L mL}^{-1}$), estimulou o crescimento do fungo *A. carbonarius* na temperatura de 15 $^{\circ}\text{C}$, diferindo-se estatisticamente do valor do diâmetro encontrado para a testemunha, o qual se esperava ser o maior em relação ao crescimento micelial. As Figuras 49, 50 e 51 mostram a inibição do crescimento micelial do fungo *A. carbonarius* pelos compostos carvacrol, citral e eugenol, respectivamente, nas concentrações que variam de 1,95 a 31,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$.

Figura 49 – Inibição do crescimento micelial de *Aspergillus carbonarius* pelo composto carvacrol, nas temperaturas de 25, 20 e 15 °C.



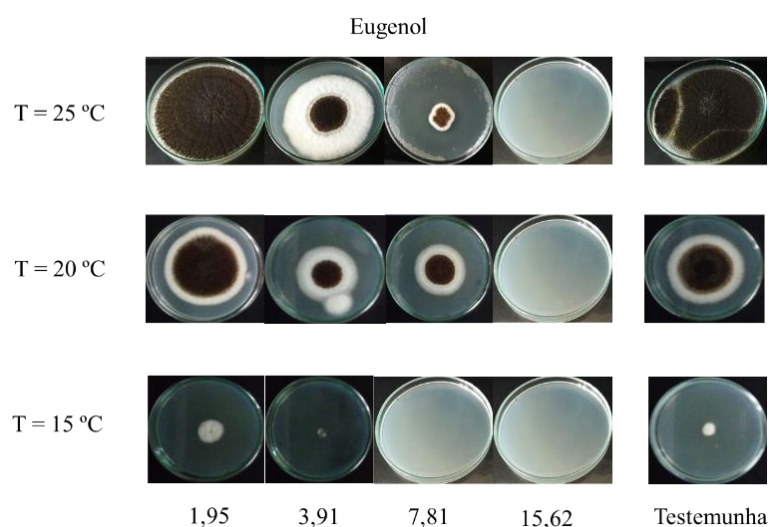
Fonte: Do autor (2018).

Figura 50 – Inibição do crescimento micelial de *Aspergillus carbonarius* pelo composto citral, nas temperaturas de 25, 20 e 15 °C.



Fonte: Do autor (2018).

Figura 51 – Inibição do crescimento micelial de *Aspergillus carbonarius* pelo composto eugenol, nas temperaturas de 25, 20 e 15 °C.



Fonte: Do autor (2018).

Pode-se perceber o efeito da temperatura ao comparar o halo de crescimento formado para as testemunhas, bem como o efeito do composto, juntamente nas diferentes temperaturas entre as concentrações estudadas. Assim, nota-se que tanto a testemunha quanto os fungos analisados apresentaram desenvolvimento inferior na temperatura de 15 °C, quando comparados com as temperaturas de 20 °C e 25 °C. A temperatura de 15 °C não propiciou o crescimento do fungo *A. carbonarius*, quando testado com o composto citral em nenhuma concentração e houve crescimento razoável para os demais compostos.

Os valores do diâmetro médio do crescimento micelial do fungos *A. niger* sobre os compostos analisados estão representados nas Tabelas 6, 7 e 8.

Tabela 6 – Diâmetro médio do crescimento micelial do fungo *Aspergillus niger* sobre o composto carvacrol.

| Concentração ($\mu\text{L mL}^{-1}$) | Temperatura (°C) | | | Inibição micelial (%) | | |
|---|------------------|----------|----------|-----------------------|---------|---------|
| | 15 | 20 | 25 | 15 | 20 | 25 |
| 1,95 | 4,033 Bc | 7,383 Bb | 8,833 Aa | 18,525 | 13,141 | 1,856 |
| 3,91 | 3,783 Bc | 7,150 Bb | 9,000 Aa | 23,576 | 15,882 | 0,000 |
| 7,81 | 1,567 Cc | 5,883 Cb | 9,000 Aa | 68,343 | 30,788 | 0,000 |
| 15,62 | 0,000 Da | 0,000 Da | 0,000 Ba | 100,000 | 100,000 | 100,000 |
| Testemunha | 4,950 Ab | 8,500 Aa | 9,000 Aa | 0,000 | 0,000 | 0,000 |

Legenda: As médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e pela mesma letra maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2018).

Tabela 7 – Diâmetro médio do crescimento micelial do fungo *Aspergillus niger* sobre o composto citral.

| Concentração ($\mu\text{L mL}^{-1}$) | Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) | | | Inibição micelial (%) | | |
|---|------------------------------------|----------|----------|-----------------------|---------|---------|
| | 15 | 20 | 25 | 15 | 20 | 25 |
| 1,95 | 4,500 Ab | 7,883 Aa | 9,000 Aa | 9,091 | 7,259 | 0,000 |
| 3,91 | 5,300 Ab | 6,500 Bb | 9,000 Aa | 0,000 | 23,529 | 0,000 |
| 7,81 | 2,450 Bc | 4,683 Cb | 6,483 Ba | 50,505 | 44,906 | 27,967 |
| 15,62 | 0,000 Ca | 0,000 Da | 0,000 Ca | 100,000 | 100,000 | 100,000 |
| Testemunha | 4,950 Ab | 8,500 Aa | 9,000 Aa | 0,000 | 0,000 | 0,000 |

Legenda: As médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e pela mesma letra maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2018).

Tabela 8 – Diâmetro médio do crescimento micelial do fungo *Aspergillus niger* sobre o composto eugenol.

| Concentração ($\mu\text{L mL}^{-1}$) | Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) | | | Inibição micelial (%) | | |
|---|------------------------------------|----------|----------|-----------------------|---------|--------|
| | 15 | 20 | 25 | 15 | 20 | 25 |
| 1,95 | 3,967 Bc | 7,783 Bb | 9,000 Aa | 19,858 | 8,435 | 0,000 |
| 3,91 | 4,700 Ac | 6,867 Cb | 9,000 Aa | 5,050 | 19,212 | 0,000 |
| 7,81 | 2,883 Cc | 6,250 Db | 9,000 Aa | 41,758 | 26,471 | 0,000 |
| 15,62 | 0,000 Db | 0,000 Eb | 1,217 Ba | 100,000 | 100,000 | 86,478 |
| Testemunha | 4,950 Ab | 8,500 Aa | 9,000 Aa | 0,000 | 0,000 | 0,000 |

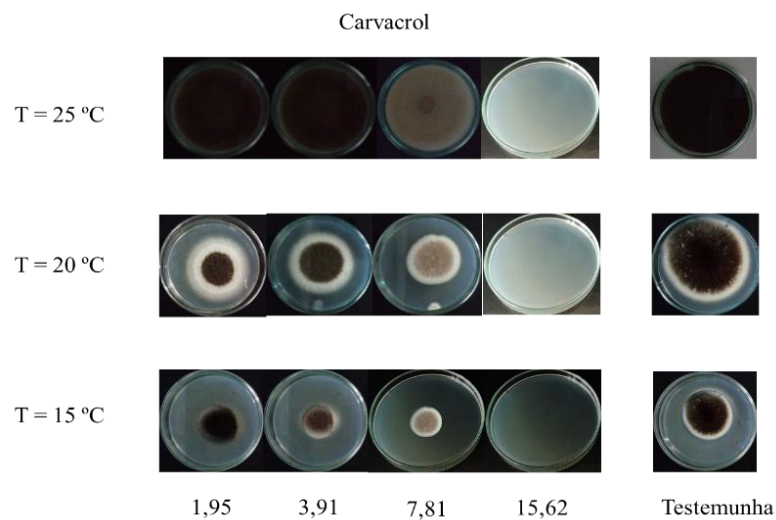
Legenda: As médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e pela mesma letra maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2018).

Ambos os compostos, carvacrol e citral, apresentaram inibição total do crescimento micelial de *A. niger* a partir da concentração de $15,625 \mu\text{L mL}^{-1}$, nas temperaturas analisadas, uma concentração acima daquela realizada no teste preliminar para CMI. Pelo teste preliminar para determinar a CMI, o eugenol apresentou uma CMI de $7,81 \mu\text{L mL}^{-1}$; entretanto mesmo em uma concentração acima dessa ocorreu crescimento micelial na temperatura de 25°C . Diante dos valores do diâmetro médio das testemunhas e dos compostos nas diferentes concentrações, observa-se que o fungo *A. niger* foi um pouco mais resistente aos efeitos da temperatura, quando comparado com *A. carbonarius*, mesmo que apresente alterações significativas. Da mesma forma que *A. carbonarius*, o fungo *A. niger* sofreu influência da temperatura em relação ao crescimento micelial, sendo a temperatura de 15°C menos favorável ao seu desenvolvimento do que as temperaturas de 20°C e 25°C .

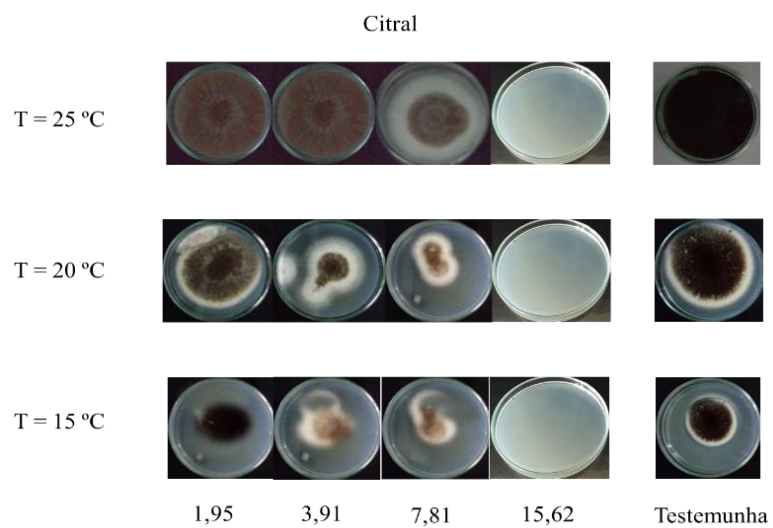
As Figuras 52, 53 e 54 mostram a inibição do crescimento micelial do fungo *A. niger* pelos compostos carvacrol, citral e eugenol, respectivamente, nas concentrações de $1,95$ a $15,62 \mu\text{L mL}^{-1}$.

Figura 52 – Inibição do crescimento micelial de *Aspergillus niger* pelo composto carvacrol, nas temperaturas de 25, 20 e 15 °C.



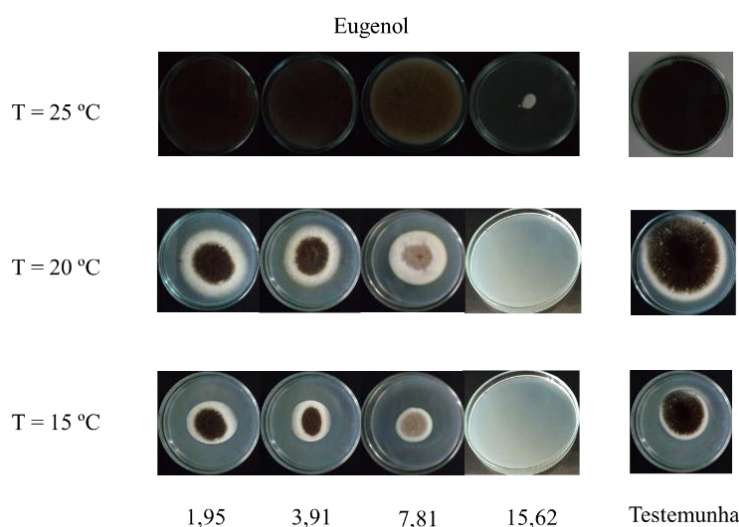
Fonte: Do autor (2018).

Figura 53 – Inibição do crescimento micelial de *Aspergillus niger* pelo composto citral, nas temperaturas de 25, 20 e 15 °C.



Fonte: Do autor (2018).

Figura 54 – Inibição do crescimento micelial de *Aspergillus niger* pelo composto eugenol, nas temperaturas de 25, 20 e 15 °C.



Fonte: Do autor (2018).

Além da influência significativa da temperatura sobre o crescimento micelial, ressalta-se a coloração do micélio, apresentando-se mais claro nas concentrações maiores, revelando, assim, uma interação do composto com o fungo, mesmo que tenha ocorrido o crescimento micelial. A perda da pigmentação não foi observada nas testemunhas, confirmando a interação do composto com o fungo e não o efeito da variação da temperatura.

Pelos dados descritos, observou-se que os compostos agiram conforme o esperado para ambos os fungos testados, visto que houve aumento na atividade de inibição do crescimento micelial com o aumento da concentração, apresentando uma relação dose-dependente sobre a atividade antifúngica.

Os dados revelam que os efeitos da temperatura influenciaram diretamente a atividade antifúngica dos fungos *A. carbonarius* e *A. niger*, atuando no crescimento micelial e, conseqüentemente, na síntese de ocratoxina. Os fungos produtores de micotoxinas estão correlacionados com a temperatura, uma vez que é evidenciado na literatura que houve baixa ou nenhuma produção em temperaturas refrigeradas, produção intermediária em torno de 12 °C e produção ótima entre 20 e 25 °C (HYMERY et al., 2014).

O controle de temperatura é um dos métodos mais utilizados de manipulação da ecologia microbiana dos alimentos. Pode ser usado para inibir o crescimento de organismos patogênicos, inativar ou matar micro-organismos indesejados, ou otimizar o crescimento ou o metabolismo dos micro-organismos nas fermentações. As células fúngicas são compostas por enzimas e a atividade funcional dessas enzimas são dependentes de sua forma ou

conformação. A temperatura afeta as ligações químicas na molécula e, se a temperatura sofre muita variação, a conformação fica distorcida a ponto de a enzima não estar mais ativada cataliticamente. Essa variação de temperatura pode resultar na desnaturação da proteína, que pode ocorrer tanto quando a temperatura está muito alta ou quando a temperatura está muito baixa (ROSS; NICHOLS, 2014).

Os micro-organismos, em particular os fungos, são conhecidos por produzir metabólitos secundários com propriedades antimicrobianas como mecanismo de defesa e também compostos com alta toxicidade, como as micotoxinas, sendo influenciados pelo efeito da temperatura (YOGABAANU et al., 2017). Pesquisas de Paterson e Lima (2011) reportaram as condições que favorecem a produção de ocratoxina A (micotoxinas produzidas por *A. carbonarius* e *A. niger*) em vinhos. Observaram que temperaturas elevadas, em torno de 30 °C, juntamente com o aumento da umidade, são fatores de risco, uma vez que acentuam a produção de OTA e que temperaturas inferiores a 21 °C são mais seguras.

De modo geral, os compostos carvacrol, citral e eugenol mostraram-se eficientes sobre os fungos filamentosos *A. carbonarius* e *A. niger*, sendo promissores na busca por compostos naturais com potencial antimicrobiano. Além disso, o processo de estocagem dos alimentos, como grãos, frutas, cereais, entre outros, é favorecido em temperaturas mais baixas, pois essas são menos propícias ao desenvolvimento dos fungos e, conseqüentemente, à produção de micotoxinas. Nesse sentido, a pesquisa por compostos de origem natural, a fim de combater o crescimento de micro-organismos prejudiciais à saúde humana, é de extrema relevância.

5 CONCLUSÃO

Pelos resultados verificou-se que os compostos fenólicos carvacrol, timol e eugenol apresentaram melhor potencial antioxidante diante das metodologias testadas, quando comparados com os padrões. Compostos menos ativos apresentaram efeito dose-resposta, revelando a influência da concentração sobre os constituintes.

Os constituintes carvacrol, timol, citral e eugenol destacaram-se na inibição da viabilidade celular das linhagens de células tumorais testadas, apresentando efeito dose-resposta. O citral mostrou maior potencial antiproliferativo entre as culturas, mostrando valores semelhantes ao controle cisplatina. Os dados apontam que esse composto induz ao bloqueio no ciclo celular na transição G1/S, mas como não houve aumento significativo na população de células na fase sub-G1, significa que o composto não estimulou a morte celular.

Os compostos eugenol, carvacrol e citral pertencentes às classes dos fenilpropanoides, monoterpenos fenólicos e monoterpenos oxigenados, respectivamente apresentaram maior atividade inibitória sobre os fungos filamentosos analisados. Verificou-se que esses compostos reduzem o crescimento micelial dos fungos *A. niger* e *A. carbonarius*, quando testados em diferentes temperaturas.

REFERÊNCIAS

- ABBASZADEH, S. et al. Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. **Journal of Medical Mycology**, v. 24, n. 2, p. 51-56, 2014.
- ABRAR, M. et al. Aflatoxins: biosynthesis, occurrence, toxicity, and remedies. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 53, n. 8, p. 862-874, 2013.
- ADRAR, N.; OUKIL, N.; BEDJOU, F. Antioxidant and antibacterial activities of *Thymus numidicus* and *Salvia officinalis* essential oils alone or in combination. **Industrial Crops and Products**, v. 88, p. 112-119, 2016.
- AHMAD, A. et al. Antifungal activity of *Coriaria nepalensis* essential oil by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. **Yeast**, v. 28, n. 8, p. 611-617, 2011.
- ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 2, p. 143-152, 2013.
- ALEKSIC, V.; KNEZEVIC, P. Antimicrobial and antioxidative activity of extracts and essential oils of *Myrtus communis* L. **Microbiological Research**, 169, 240-254, 2014.
- ALMEIDA, V. L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 118-129, jan./fev. 2005.
- ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- AMORATI, R.; FOTI, M. C.; VALGIMIGLI, L. Antioxidant activity of essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 61, n. 46, p. 10835-10847, 2013.
- ANDRADE, M. A. et al. Biological activity of the essential oils from *Cinnamodendron dinisii* and *Siparuna guianensis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 189-194, 2015.
- ANDRADE, M. A. et al. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 2, p. 399-408, abr./jun. 2012.
- AYDIN, E.; TÜRKEZ, H.; KELEŞ, M. S. The effect of carvacrol on healthy neurons and N2a cancer cells: some biochemical, anticancerogenicity and genotoxicity studies. **Cytotechnology**, v. 66, n. 1, p. 149-157, 2014.
- BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 23 n. 4, p. 629-643, jul./ago. 2010.
- BAYALA, B. et al. Anticancer activity of essential oils and their chemical components - A review. **American Journal of Cancer Research**, v. 4, n. 6, p. 591-607, 2014.

BHALLA, Y.; GUPTA, V. K.; JAITAK, V. Anticancer activity of essential oils: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 15, p. 3643-3653, 2013.

BHAT, R.; RAI, R. V.; KARIM, A. A. Mycotoxins in food and feed: present status and future concerns. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, n. 1, p. 57-81, 2010.

BHATTI, H. N. et al. Biotransformation of monoterpenoids and their antimicrobial activities. **Phytomedicine**, v. 21, n. 12, p. 1597-1626, 2014.

BORGES, L. L. et al. Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 7, n. 12, p. 1-20, 2011.

BOULANOUAR, B. et al. Antioxidant activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils. **Industrial Crops and Products**, v.16, p.85-96, 2013.

BRANDÃO, R. M. **Óleos essenciais de *Lippia origanoides* Kunth. e *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish: quantificação do ergosterol sobre os fungos *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus ochraceus*, atividade antiocrotogênica e antiaflatoxigênica.** 2017. 108p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2017.

BRASIL. Vigilância sanitária. **Antimicrobianos – Bases Teóricas e Uso Clínico.** 2017. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/conceitos.htm> Acesso em 08 de dezembro de 2017.

BRIZZOLARI, A. et al. Effect of organic co-solvents in the evaluation of the hydroxyl radical scavenging activity by the 2-deoxyribose degradation assay: The paradigmatic case of α -lipoic acid. **Biophysical Chemistry**, v. 220, p. 1-6, 2017.

CAMARGO, K. C. et al. Antimicrobial activity of the essential oil from *Hyptis carpinifolia* Benth. **American Journal of Plant Sciences**, v. 8, n. 11, p. 2871, 2017.

CASTRO, N. E. A. et al. Avaliação de rendimento e dos constituintes químicos do óleo essencial de folhas de *Eucalyptus citriodora* Hook. colhidas em diferentes épocas do ano em municípios de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Plantas Medicináveis**, v. 10, n. 1, p. 70-75, 2008.

CAVALCANTI, S. C. H.; DE OLIVEIRA, R. R. B.; DE SOUSA, D. P. Antitumor Essential Oils: Progress in Medicinal Chemistry. In: **Bioactive Essential Oils and Cancer.** Springer International Publishing, p. 111-124, 2015.

CHRISTODOULEAS, D. C. et al. Modified DPPH and ABTS assays to assess the antioxidant profile of untreated oils. **Food Analytical Methods**, v. 8, n. 5, p. 1294-1302, 2015.

COMŞA, Ş.; CIMPEAN, A. M.; RAICA, M. The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 years of experience in research. **Anticancer Research**, v. 35, n. 6, p. 3147-3154, 2015.

COTINGUIBA, G. G. et al. Método de avaliação da defesa antioxidante: uma revisão de literatura. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 15, n. 3, 2013.

CRISTANI, M. et al. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 15, p. 6300-6308, 2007.

D'AMATO, S. et al. Hydrosols: Biological activity and potential as antimicrobials for food applications. **Food Control**, v. 86, p. 126-137, 2018.

DAWIDOWICZ, A. L.; OLSZOWY, M. Does antioxidant properties of the main component of essential oil reflect its antioxidant properties? The comparison of antioxidant properties of essential oils and their main components. **Natural Product Research**, v. 28, n. 22, p. 1952-1963, 2014.

DENG, J.; CHENG, W.; YANG, G. A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay. **Food Chemistry**, v. 125, n. 4, p. 1430-1435, 2011.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3rd ed. Chichester: J. Wiley, 539 p. 2009.

DOS SANTOS, M. C. et al. Micotoxinas e seu potencial como agentes de guerra. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 3, p. 761-778, 2014.

DRESLER, S. et al. Selected secondary metabolites in *Echium vulgare* L. populations from nonmetalliferous and metalliferous areas. **Phytochemistry**, v. 133, p. 4-14, 2017.

DZOYEM, J. P. et al. Cytotoxicity, antimicrobial and antioxidant activity of eight compounds isolated from *Entada abyssinica* (Fabaceae). **BMC Research Notes**, v. 10, n. 1, p. 118, 2017.

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 4, p. 308-323, 2007.

EMBUSCADO, M. E. Spices and herbs: natural sources of antioxidants – a mini review. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 811-819, 2015.

FALOWO, A. B.; FAYEMI, P. O.; MUCHENJE, V. Natural antioxidants against lipid-protein oxidative deterioration in meat and meat products: A review. **Food Research International**, v. 64, p. 171-181, 2014.

FAN, K. et al. Carvacrol inhibits proliferation and induces apoptosis in human colon cancer cells. **Anti-cancer Drugs**, v. 26, n. 8, p. 813-823, 2015.

FERLAY J. et al. GLOBOCAN. **Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase v.1**, n. 11, 2012. [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on 12/03/17.

FERNANDES, J. Antitumor Monoterpenes. In: **Bioactive Essential Oils and Cancer**. Springer International Publishing, p. 175-200, 2015.

FERRAZ, L. C.; SANTOS, A. B. R.; DISCACCIATI, M. G. Ciclo celular, HPV e evolução da neoplasia intraepitelial cervical: seleção de marcadores biológicos. **Journal Health Science Instruction**, v. 30, n. 2, 2012.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, Nov./ Dez. 2011.

FERREIRA-SILVA, G. Á. et al. Casearin D inhibits ERK phosphorylation and induces downregulation of cyclin D1 in HepG2 cells. **Toxicology in Vitro**, v. 38, p. 27-32, 2017.

FILHO, F. C. C.; CALDAS, M. L.; MURATORI, M. C. S. Fungos e aflatoxinas em cereais: uma revisão. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v. 2, n. 2, p. 122-130, 2015.

FOSTER, I. Cancer: A cell cycle defect. **Radiography**, v. 14, n. 2, p. 144-149, 2008.

GALI-MUHTASIB, H. Anticancer and medicinal properties of essential oil and extracts of East Mediterranean sage (*Salvia triloba*). **Advances in Phytomedicine**, v. 2, p. 169-180, 2006.

GALI-MUHTASIB, H. U.; AFFARA, N. I. Chemopreventive effects of sage oil on skin papillomas in mice. **Phytomedicine**, v. 7, n. 2, p. 129-136, 2000.

GAUTAM, N.; MANTHA, A. K.; MITTAL, S. Essential oils and their constituents as anticancer agents: a mechanistic view. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

GEORGE, V. C.; DELLAIRE, G.; RUPASINGHE, H. P. V. Plant flavonoids in cancer chemoprevention: role in genome stability. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 45, p. 1-14, 2017.

GIAGINIS, C.; THEOCHARIS, S. Current evidence on the anticancer potential of Chios mastic gum. **Nutrition and Cancer**, v. 63, n. 8, p. 1174-1184, 2011.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GOMES, M. S. et al. Use of Essential Oils of the Genus *Citrus* as Biocidal Agents. **American Journal of Plant Sciences**, v. 5, p. 299-305, 2014.

GUIMARÃES, L. G. L et al. Atividades antioxidante e fungitóxica do óleo essencial de capim-limão e do citral. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 2, p. 464-472, abr./jun.2011.

GUPTE, M. et al. Major differences between tumor and normal human cell fates after exposure to chemotherapeutic monofunctional alkylator. **PloS One**, v. 8, n. 9, p. e74071, 2013.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v.144, n. 4, p. 646-674, 2011.

HAWKSWORTH, D. L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. **Mycological Research**, v. 95, n. 6, p. 641-655, 1991.

HSU, S. S. et al. Effect of thymol on Ca²⁺ homeostasis and viability in human glioblastoma cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 670, n. 1, p. 85-91, 2011.

HU, Y. et al. Mechanisms of antifungal and anti-aflatoxigenic properties of essential oil derived from turmeric (*Curcuma longa* L.) on *Aspergillus flavus*. **Food Chemistry**, v. 220, p. 1-8, 2017.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R. L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, 2012.

HYMERY, N. et al. Filamentous fungi and mycotoxins in cheese: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 4, p. 437-456, 2014.

JAAFARI, A. et al. Comparative study of the antitumor effect of natural monoterpenes: relationship to cell cycle analysis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 3, p. 534-540, 2012.

KANG, S. H. et al. Anticancer effect of thymol on AGS human gastric carcinoma cells. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 1, p. 28-37, 2016.

KARRE, L.; LOPEZ, K.; GETTY, K. J. K. Natural antioxidants in meat and poultry products. **Meat Science**, v. 94, n. 2, p. 220-227, 2013.

KORDALI, S. et al. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and *p*-cymene. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 18, p. 8788-8795, 2008.

KOTTA-LOIZOU, I.; COUTTS, R. H. A. Mycoviruses in Aspergilli: A Comprehensive Review. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1699, 2017.

KOZIOL, A. et al. An overview of the pharmacological properties and potential applications of natural monoterpenes. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 14, p. 1156-1168, 2014.

KULISIC, T. et al. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. **Food Chemistry**, v. 85, n. 4, p. 633-640, 2004.

LAGROUH, F.; DAKKA, N.; BAKRI, Y. The antifungal activity of Moroccan plants and the mechanism of action of secondary metabolites from plants. **Journal of Medical Mycology**, v. 27, p. 303-311, 2017.

LEITE, M. C. A. et al. Evaluation of antifungal activity and mechanism of action of citral against *Candida albicans*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.

LESGARDS, J. F. et al. Anticancer activities of essential oils constituents and synergy with conventional therapies: a review. **Phytotherapy Research**, v. 28, n. 10, p. 1423-1446, 2014.

LI, Y. et al. Thymol inhibits bladder cancer cell proliferation via inducing cell cycle arrest and apoptosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2017.

LOPES-LUTZ, D. et al. Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. **Phytochemistry**, v. 69, n. 8, p. 1732-1738, 2008.

LOPES, M. T. P.; JÚNIOR, D. D.; LEMOS, F. O. Antitumor Phenylpropanoids. In: **Bioactive Essential Oils and Cancer**. Springer, Cham, 2015. p. 215-230.

LÓPEZ-ALARCÓN, C.; DENICOLA, A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. **Analytica Chimica Acta**, v. 763, p. 1-10, 2013.

MAGALHÃES, L. M. et al. Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, v. 613, n. 1, p. 1-19, 2008.

MARCHESE, A. et al. Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint. **Critical Reviews in Microbiology**, p. 1-22, 2017.

MAREČEK, V. et al. ABTS and DPPH methods as a tool for studying antioxidant capacity of spring barley and malt. **Journal of Cereal Science**, v. 73, p. 40-45, 2017.

MARKOVIĆ, T. et al. Essential oils for the prevention and treatment of human opportunistic fungal diseases. In: **Medicinal and Aromatic Crops: Production, Phytochemistry, and Utilization**. American Chemical Society, p. 247-277, 2016.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica Básica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 736, 2007.

MAZIERO, M. T.; BERSOT, L. dos S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.12, p.89-99, 2010.

MIGUEL, M. G. Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants: A review. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, n. 5, p. 291-312, 2010a.

MIGUEL, M. G. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 9252-9287, 2010b.

MIRANDA, C. A. S. F. et al. Correlação entre composição química e eficácia antioxidante de óleos essenciais de plantas condimentares por análise de agrupamentos hierárquicos (HCA). **E-xacta**, Belo horizonte, v. 7, n. 1, p. 65-74, 2014.

MURATA, S. et al. Antitumor effect of 1,8-cineole against colon cancer. **Oncology Reports**, v. 30, n. 6, p. 2647-2652, 2013.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

NIELSEN, K. F. et al. Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 395, n. 5, p. 1225-1242, 2009.

NIETO, G. Biological Activities of Three Essential Oils of the Lamiaceae Family. **Medicines**, v. 4, n. 3, p. 63, 2017.

NIKOLIĆ, M. et al. Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 183-190, 2014.

NIMSE, S. B.; PAL, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. **The Royal Society of Chemistry Advances**, v. 5, n. 35, p. 27986-28006, 2015.

OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais *in vitro* pelo método do DPPH•: estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, p. 36-44, 2015.

OLIVEIRA, L. B. S. et al. Atividade antifúngica e possível mecanismo de ação do óleo essencial de folhas de *Ocimum gratissimum* (Linn.) sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 2, p. 511-523, 2016.

OLIVEIRA, M. C.; SCHOFFEN, J. P. F. Oxidative stress action in cellular aging. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 6, p. 1333-1342, nov./dec. 2010.

ÖZYÜREK, M. et al. Hydroxyl radical scavenging assay of phenolics and flavonoids with a modified cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method using catalase for hydrogen peroxide degradation. **Analytica Chimica Acta**, v. 616, n. 2, p. 196-206, 2008.

PATEL, P. B.; THAKKAR, V. R.; PATEL, J. S. Cellular effect of curcumin and citral combination on breast cancer cells: induction of apoptosis and cell cycle arrest. **Journal of Breast Cancer**, v. 18, n. 3, p. 225-234, 2015.

PATERSON, R. R. M. et al. Predominant mycotoxins, mycotoxigenic fungi and climate change related to wine. **Food Research International**, 2017.

PATERSON, R. R. M.; LIMA, N. Further mycotoxin effects from climate change. **Food Research International**, v. 44, n. 9, p. 2555-2566, 2011.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Palmas, v. 3, n. 4, p. 46-152, nov. 2012.

PEREIRA, K. C.; DOS SANTOS, C. F. Micotoxinas e seu potencial carcinogênico. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 15, n. 4, p. 147-165, 2011.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55-74, 2015.

PISOSCHI, A. M. et al. An overview of natural antimicrobials role in food. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2017.

PRAKASH, B. et al. Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities – Potentials and challenges. **Food Control**, v. 47, p. 381-391, 2015.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specifica application to the determination of vitamin E1. **Analytical Biochemistry**, v. 269, p. 337–341, 1999.

RAMPERSAD, S. N. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. **Sensors**, v. 12, n. 9, p. 12347-12360, 2012.

RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 250-264, 2014.

R Core Team. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, (2017). URL <https://www.R-project.org/>.

REPETTO, M.; SEMPRINE, J.; BOVERIS, A. Lipid peroxidation: chemical mechanism, biological implications and analytical determination. In: **Lipid peroxidation**. InTech, 2012.

REZENDE, D. A. C. S. et al. Characterization of the biological potential of the essential oils from five species of medicinal plants. **American Journal of Plant Sciences**, v. 8, n. 02, p. 154-170, 2017.

RODRÍGUEZ, A. et al. Detection of filamentous fungi in foods. **Current Opinion in Food Science**, v. 5, p. 36-42, 2015.

ROSS, T.; NICHOLS, D. S. Influence of Temperature. In: **Encyclopedia of Food Microbiology**. University of Tasmania, Hobart, TAS, Australia, p. 602–609, 2014.

SANCHES, L. J. et al. Cytotoxicity of citral against melanoma cells: The involvement of oxidative stress generation and cell growth protein reduction. **Tumor Biology**, v. 39, n. 3, p. 1-15, 2017.

SANTIAGO, J. A. et al. Effect of the essential oils from *Melaleuca alternifolia*, *Melaleuca quinquenervia* and *Backhousia citriodora* on the synthesis of ochratoxin A by *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* isolated from tropical wine grapes. **Journal of Food Science and Technology**, p. 1-6, 2017.

SANTOS, M. H. et al. Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade antioxidante do café (*Coffea arabica*). **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 604-610, 2007.

SARDI, J. C. O. et al. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 10-24, 2013.

SATOOKA, H.; KUBO, I. Effects of thymol on B16-F10 melanoma cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 10, p. 2746-2752, 2012.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Measurement of antioxidant activity. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 757-781, 2015.

SHETTIGAR, N. et al. Thymol, a monoterpene phenolic derivative of cymene, abrogates mercury-induced oxidative stress resultant cytotoxicity and genotoxicity in hepatocarcinoma cells. **Environmental toxicology**, v. 30, n. 8, p. 968-980, 2015.

SHIVAKUMAR, A.; KUMAR, M. S. Y. Critical Review on the Analytical Mechanistic Steps in the Evaluation of Antioxidant Activity. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, 2018. DOI: 10.1080/10408347.2017.1400423.

SILVA, E. R. et al. Capacidade antioxidante e composição química de grãos integrais de geladim creme e preto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 7, p. 736-742, 2011a.

SILVA, F. et al. Antifungal activity of *Coriandrum sativum* essential oil, its mode of action against *Candida* species and potential synergism with amphotericin B. **Phytomedicine**, v. 19, n. 1, p. 42-47, 2011b.

SILVA, L. F. et al. Óleo essencial de *Satureja montana* L.: Análise cromatográfica, determinação das atividades antioxidante e antifúngica. **E-xacta**, v. 8, n. 2, p. 55-63, 2015.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFSC/UFRGS, 2007. 1104 p.

SINGH, H. P. et al. Assessment of *in vitro* antioxidant activity of essential oil of *Eucalyptus citriodora* (lemon-scented Eucalypt; Myrtaceae) and its major constituents. **LWT-Food science and Technology**, v. 48, n. 2, p. 237-241, 2012.

SINGH, P. et al. Assessment of Pelargonium graveolens oil as plant-based antimicrobial and aflatoxin suppressor in food preservation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, n. 14, p. 2421-2425, Nov. 2008.

SOARES, N. C. P. et al. Licopeno induz parada de ciclo celular e apoptose em linhagem humana de câncer de cólon. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 12, n. 2, p. 143-148, 2013.

SOBRAL, M. V. et al. Antitumor activity of monoterpenes found in essential oils. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

SU, D. M. et al. Two types of human malignant melanoma cell lines revealed by expression patterns of mitochondrial and survival-apoptosis genes: implications for malignant melanoma therapy. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 8, n. 5, p. 1292-1304, 2009.

SUCUPIRA, N. R. et al. Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 14, n. 4, p. 263-270, 2012.

SUN, J.; DENG, Z.; YAN, A. Bacterial multidrug efflux pumps: mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 453, n. 2, p. 254-267, 2014.

TAO, N.; OUYANG, Q.; JIA, L. Citral inhibits mycelial growth of *Penicillium italicum* by a membrane damage mechanism. **Food Control**, v. 41, p. 116-121, 2014.

TEIXEIRA, M. L. **Óleos essenciais de *Cantinoa carpinifolia* (Benth.) e *Lippia origanoides* Kunth.: composição química, atividade antioxidante e potencial farmacológico.** 2016. 191 p. Tese (Doutorado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

TEIXEIRA, M. L. et al. *Citrumelo Swingle*: Caracterização química, atividade antioxidante e antifúngica dos óleos essenciais das cascas frescas e secas. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 24, n. 3, p. 194-203, jul./set. 2012.

TEIXEIRA, M. L. et al. Essential oils from *Lippia origanoides* Kunth and *Mentha spicata* L.: Chemical composition, insecticidal and antioxidant activities. **American Journal of Plant Sciences**, v. 5, n. 9, p. 1181-1190, abr. 2014.

TIAN, J. et al. The mechanism of antifungal action of essential oil from dill (*Anethum graveolens* L.) on *Aspergillus flavus*. **PLoS one**, v. 7, n. 1, p. e30147, 2012.

TIWARI, P. SANGWAN, R. S.; SANGWAN, N. S. Plant secondary metabolism linked glycosyltransferases: An update on expanding knowledge and scopes. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 5, p. 714-739, 2016.

TORRE, L. A. et al. Global cancer statistics, 2012. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 65, n. 2, p. 87-108, 2015.

ULTEE, A.; BENNIK, M. H. J.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 1561-1568, 2002.

VASCONCELOS, T. B. et al. Radicais livres e antioxidantes: proteção ou perigo?. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 16, n. 3, 2014.

VIEIRA, P. R. N. et al. Chemical composition and antifungal activity of essential oils from *Ocimum* species. **Industrial Crops and Products**, v. 55, p. 267-271, 2014.

VISAGIE, C. M. et al. Ochratoxin production and taxonomy of the yellow aspergilli (*Aspergillus* section *Circumdati*). **Studies in Mycology**, v. 78, p. 1-61, 2014.

WANG, Y. et al. Inhibitory effect of nerol against *Aspergillus niger* on grapes through a membrane lesion mechanism. **Food Control**, v. 55, p. 54-61, 2015.

WINK, M. Secondary metabolites, the role in plant diversification of. In: **Encyclopedia of Evolutionary Biology**. p. 1-9, 2016, <doi:10.1016/B978-0-12-800049-6.00263-8>.

WU, Z. L. et al. Essential oil and its major compounds from oil camphor inhibit human lung and breast cancer cell growth by cell-cycle arresting. **International Journal of Clinical & Experimental Medicine**, v. 9, n. 7, 2016.

XIANG, H. et al. Chemical compositions, antioxidative, antimicrobial, anti-inflammatory and antitumor activities of *Curcuma aromatica* Salisb. essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 108, p. 6-16, 2017.

XIAO, Z.; MORRIS-NATSCHKE, S. L.; LEE, K. H. Strategies for the optimization of natural leads to anticancer drugs or drug candidates. **Medicinal Research Reviews**, v. 36, n. 1, p. 32-91, 2016.

XIE, Y. et al. Antifungal activity of several essential oils and major components against wood-rot fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 108, p. 278-285, 2017.

YIN, Q. H. et al. Anti-proliferative and pro-apoptotic effect of carvacrol on human hepatocellular carcinoma cell line HepG-2. **Cytotechnology**, v. 64, n. 1, p. 43-51, 2012.

YIN, X. et al. Anticancer activity and mechanism of *Scutellaria barbata* extract on human lung cancer cell line A549. **Life Sciences**, v. 75, n. 18, p. 2233-2244, 2004.

YOGABAANU, U. et al. Antimicrobial properties and the influence of temperature on secondary metabolite production in cold environment soil fungi. **Polar Science**, v. 14, p. 60-67, 2017.

ZENGİN, H.; BAYSAL, A. H. Antibacterial and antioxidant activity of essential oil terpenes against pathogenic and spoilage-forming bacteria and cell structure-activity relationships evaluated by SEM microscopy. **Molecules**, v. 19, n. 11, p. 17773-17798, 2014.

ZORE, G. B. et al. Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. **Phytomedicine**, v. 18, n. 13, p. 1181-1190, 2011.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Valores dos coeficientes de regressão lineares e angulares

| Método do sequestro de radicais DPPH | Coeficiente linear | Coeficiente angular |
|--------------------------------------|--------------------|---------------------|
| Comp01 | 29.5987083620 | 1.226864e-01 |
| Comp02 | 0.3130104811 | 4.042039e-04 |
| Comp03 | -0.0543112257 | 8.790943e-04 |
| Comp04 | -0.0848725086 | 4.998699e-03 |
| Comp05 | 0.2859044101 | 1.507209e-04 |
| Comp06 | 2.5008709049 | -6.892415e-03 |
| Comp07 | 0.1033795533 | 8.116678e-04 |
| Comp08 | 2.6113251432 | 4.029628e-02 |
| Comp09 | -0.0005191867 | 1.299556e-03 |
| Comp10 | 0.0374254296 | 8.930630e-04 |
| Comp11 | 0.2640853952 | 9.334135e-04 |
| Comp12 | 0.4063514891 | -4.317075e-04 |
| Comp13 | 3.2639761741 | 4.404776e-02 |
| Comp14 | 0.1153166363 | 7.125223e-04 |
| Comp15 | 0.3502655212 | -8.464299e-06 |
| Comp16 | 0.4958300115 | 6.610031e-03 |
| Comp17 | -0.6586142039 | 1.137629e-02 |
| Comp18 | 1.5639919817 | -2.520139e-03 |
| Comp19 | 0.1782329324 | -2.233181e-04 |
| Comp20 | 3.8701345934 | -6.234334e-03 |
| Comp21 | -1.0409289233 | 1.387783e-02 |
| Comp22 | -0.3632175258 | 1.044187e-02 |
| Comp23 | 0.7755880871 | -1.137895e-03 |
| Comp24 | 1.0802097365 | 6.927988e-05 |
| Comp25 | 0.0964839633 | 1.062833e-03 |
| Comp26 | 4.2009601375 | -4.575624e-03 |
| Comp27 | 6.8667368270 | -1.848956e-02 |
| Comp28 | 50.6998271478 | 9.577598e-02 |
| Comp29 | 11.1795628866 | -2.549744e-02 |
| Método ABTS | | |
| Comp01 | 26.6342477 | 0.1283752936 |
| Comp02 | 0.6852820 | 0.0027604651 |
| Comp03 | 0.9810350 | -0.0003274601 |
| Comp04 | 1.4424617 | 0.0022419359 |
| Comp05 | 3.8837556 | -0.0072668148 |
| Comp06 | 7.6908284 | -0.0211459076 |
| Comp07 | 1.5855245 | -0.0016149317 |
| Comp08 | 52.7239954 | 0.0892188751 |
| Comp09 | 3.0304967 | -0.0062733677 |
| Comp10 | 2.6628911 | -0.0007928660 |
| Comp11 | 1.9119573 | -0.0004424063 |
| Comp12 | 5.0292966 | -0.0054302818 |
| Comp13 | 53.3608423 | 0.1114863559 |
| Comp14 | 0.4152810 | 0.0022264282 |

| | | |
|---|---------------|---------------|
| Comp15 | 3.3182900 | -0.0044131737 |
| Comp16 | 1.2837128 | 0.0205864658 |
| Comp17 | -1.3394564 | 0.0302939565 |
| Comp18 | 2.4346982 | -0.0010586308 |
| Comp19 | 1.9836983 | -0.0021366964 |
| Comp20 | 11.6619216 | -0.0222409813 |
| Comp21 | -0.6092279 | 0.0439970943 |
| Comp22 | 2.3789452 | 0.0443232287 |
| Comp23 | 0.7389470 | 0.0015618595 |
| Comp24 | 1.6925513 | -0.0009815105 |
| Comp25 | 1.8416383 | 0.0009890187 |
| Comp26 | 3.6819597 | -0.0042168767 |
| Comp27 | 4.1528730 | -0.0063648454 |
| Comp28 | 74.4730565 | 0.0594134677 |
| Comp29 | 3.3597794 | -0.0033568018 |
| Método Hidroxil | | |
| Comp01 | 4.182115e+00 | 5.777100e-02 |
| Comp02 | -1.291593e+00 | 1.152399e-02 |
| Comp03 | 2.697480e+00 | 9.632521e-02 |
| Comp04 | 3.309039e+00 | 2.024751e-03 |
| Comp05 | 9.114966e+00 | 6.705901e-02 |
| Comp06 | 1.025423e+01 | 9.162268e-02 |
| Comp07 | -9.349839e-01 | 8.342212e-03 |
| Comp08 | 3.701958e+00 | 1.094292e-02 |
| Comp09 | 3.262280e+00 | 1.048563e-01 |
| Comp10 | 1.166787e+01 | -1.649286e-02 |
| Comp11 | 3.732905e+00 | 6.822748e-02 |
| Comp12 | -7.617411e-01 | 6.796487e-03 |
| Comp13 | -3.546873e+00 | 6.304168e-02 |
| Comp14 | -3.090435e+00 | 4.573594e-02 |
| Comp15 | 5.914266e-01 | 6.171191e-02 |
| Comp16 | -8.279549e-16 | 4.545635e-18 |
| Comp17 | 1.790297e+00 | 5.014996e-03 |
| Comp18 | 1.189386e+01 | 6.019188e-02 |
| Comp19 | -3.675255e+00 | 6.795902e-02 |
| Comp20 | 8.292005e-01 | 8.698036e-02 |
| Comp21 | -3.080295e+00 | 3.611087e-02 |
| Comp22 | -1.647574e+00 | 3.727170e-02 |
| Comp23 | 4.488397e+00 | 7.548530e-02 |
| Comp24 | 9.001486e+00 | 1.158515e-01 |
| Comp25 | 5.214612e+00 | -6.965372e-03 |
| Comp26 | 2.856411e+00 | 5.625024e-02 |
| Comp27 | 5.002894e+00 | 6.299946e-02 |
| Comp28 | 1.150016e+00 | 1.057757e-01 |
| Comp29 | 4.371346e+00 | 2.132581e-02 |
| Método β-caroteno | | |
| Comp01 | 5.796252e+01 | 7.053094e-02 |
| Comp02 | 2.585771e+00 | 3.032928e-02 |
| Comp03 | -2.664022e-31 | 1.462600e-33 |
| Comp04 | 1.318234e+01 | 1.457208e-01 |

| | | |
|--------|---------------|---------------|
| Comp05 | 7.799501e+00 | 1.025220e-01 |
| Comp06 | -9.008892e-01 | 1.526436e-01 |
| Comp07 | -4.731171e-16 | 2.597506e-18 |
| Comp08 | 3.799507e+00 | 1.305608e-01 |
| Comp09 | 2.672513e+00 | 6.443486e-02 |
| Comp10 | 3.584470e-01 | 3.852556e-02 |
| Comp11 | 3.334679e+00 | 6.449248e-02 |
| Comp12 | 9.852845e+00 | 5.591224e-02 |
| Comp13 | 1.253268e+01 | 1.343971e-01 |
| Comp14 | 4.431153e+00 | 1.231414e-01 |
| Comp15 | 7.612390e-01 | 3.276635e-02 |
| Comp16 | -1.168008e-15 | 6.412592e-18 |
| Comp17 | 8.607007e+00 | 1.793660e-02 |
| Comp18 | -1.489645e+00 | 6.627040e-02 |
| Comp19 | 4.774225e+00 | 5.490519e-02 |
| Comp20 | 1.032560e+01 | 4.742344e-03 |
| Comp21 | 1.254826e+01 | 5.467115e-04 |
| Comp22 | 1.462653e+00 | 4.087223e-02 |
| Comp23 | 3.204977e+01 | -3.593424e-02 |
| Comp24 | 4.038941e+00 | 1.139800e-02 |
| Comp25 | 1.906200e+01 | 1.114005e-01 |
| Comp26 | 2.047660e+00 | 3.266703e-02 |
| Comp27 | 2.676290e+00 | 1.092676e-02 |
| Comp28 | 2.350731e+01 | 6.278373e-02 |
| Comp29 | 2.831088e+00 | 1.804229e-02 |

**Método de redução do
ferro**

| | | |
|--------|------------|---------------|
| Comp01 | 0.02683300 | 1.640525e-03 |
| Comp02 | 0.07395104 | 1.450331e-05 |
| Comp03 | 0.05516008 | 3.423743e-05 |
| Comp04 | 0.07224732 | 2.738938e-05 |
| Comp05 | 0.07516134 | 7.379806e-06 |
| Comp06 | 0.08997638 | -3.376032e-05 |
| Comp07 | 0.07354715 | 1.120744e-05 |
| Comp08 | 0.12512995 | 6.879166e-04 |
| Comp09 | 0.07444360 | 6.053232e-06 |
| Comp10 | 0.07415767 | 1.464470e-05 |
| Comp11 | 0.07348597 | 1.512069e-05 |
| Comp12 | 0.08159172 | 5.751303e-06 |
| Comp13 | 0.10540110 | 9.031827e-04 |
| Comp14 | 0.07414221 | 1.421884e-05 |
| Comp15 | 0.05139328 | 2.043431e-05 |
| Comp16 | 0.04462294 | 7.392142e-05 |
| Comp17 | 0.05743676 | 6.335108e-05 |
| Comp18 | 0.06325649 | 1.070441e-05 |
| Comp19 | 0.06489459 | 9.733277e-06 |
| Comp20 | 0.06394491 | 6.907759e-06 |
| Comp21 | 0.05666274 | 6.854753e-05 |
| Comp22 | 0.05698057 | 1.604095e-04 |
| Comp23 | 0.08699371 | -4.111083e-05 |

| | | |
|--|------------|---------------|
| Comp24 | 0.06144081 | 1.660668e-05 |
| Comp25 | 0.06366324 | 2.664267e-04 |
| Comp26 | 0.05747106 | 7.050838e-05 |
| Comp27 | 0.06753287 | -5.278130e-06 |
| Comp28 | 0.18478927 | 1.774446e-03 |
| Comp29 | 0.06597997 | 2.888382e-05 |
| Método de redução do molibdênio | | |
| Comp01 | 0.05006840 | 3.490421e-03 |
| Comp02 | 0.12371546 | 7.822036e-04 |
| Comp03 | 0.09427182 | 1.697716e-04 |
| Comp04 | 0.09122357 | 2.598259e-04 |
| Comp05 | 0.14529041 | 3.328968e-04 |
| Comp06 | 0.25854584 | 4.832418e-04 |
| Comp07 | 0.11772163 | 8.148447e-04 |
| Comp08 | 0.09879100 | 1.053114e-04 |
| Comp09 | 0.13147288 | -6.313477e-06 |
| Comp10 | 0.14915771 | 7.441346e-04 |
| Comp11 | 0.17900904 | 9.486230e-04 |
| Comp12 | 0.24784028 | 7.842048e-04 |
| Comp13 | 0.09178443 | 1.882938e-04 |
| Comp14 | 0.15137640 | -7.790424e-05 |
| Comp15 | 0.15481969 | 1.541863e-03 |
| Comp16 | 0.05818826 | 1.284021e-03 |
| Comp17 | 0.12197676 | 3.525380e-04 |
| Comp18 | 0.16241886 | 1.719209e-04 |
| Comp19 | 0.09530706 | 8.837403e-05 |
| Comp20 | 0.07363638 | 2.823861e-04 |
| Comp21 | 0.00402932 | 4.132679e-03 |
| Comp22 | 0.19236553 | 1.894439e-03 |
| Comp23 | 0.07300879 | 9.601279e-04 |
| Comp24 | 0.11381593 | 7.217040e-04 |
| Comp25 | 0.23911703 | 1.112887e-03 |
| Comp26 | 0.20265403 | 1.133622e-03 |
| Comp27 | 0.14603929 | -6.280862e-05 |
| Comp28 | 0.33668720 | 3.798773e-03 |
| Comp29 | 0.18693735 | 1.502432e-03 |

Legenda: 01- Controle positivo; 02 – β -pineno; 03 – *trans*-cariofileno; 04 – Metileugenol; 05 – 1,8-cineol; 06 – Geraniol; 07 – α -pineno; 08 – Carvacrol; 09 – Borneol; 10 – α -bisabolol; 11 – Linalol; 12 – Limoneno; 13 – Timol; 14 – 4-Alilanisol; 15 – Citral; 16 – Mirceno; 17 – *p*-cimeno; 18 – β -citronelol; 19 – Mentol; 20 – Carvona; 21 – Citronelal; 22 – *trans*-anetol; 23 – Cânfora; 24 – Cineol; 25 – α -terpineol; 26 – Precoceno; 27 – *p*-anisaldeído; 28 – Eugenol; 29 – *trans*-farnesol.

Fonte: Do autor (2018).