



JÉSSICA OLIVEIRA E NOGUEIRA

**AÇÃO ANTIMICROBIANA DE DIFERENTES TERPENOS E
FENILPROPANOIDES EM *Escherichia coli* E *Staphylococcus
aureus***

LAVRAS – MG

2019

JÉSSICA OLIVEIRA E NOGUEIRA

**AÇÃO ANTIMICROBIANA DE DIFERENTES TERPENOS E
FENILPROPANOIDES EM *Escherichia coli* E *Staphylococcus aureus***

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 obtenção do título de Mestre.

Profa. Dra. Maria das Graças Cardoso
Orientadora

Prof. Dr. Luís Roberto Batista
Coorientador

**LAVRAS – MG
2019**

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

Nogueira, Jéssica Oliveira e.

Ação Antimicrobiana De Diferentes Terpenos E
Fenilpropanoides Em *Escherichia coli* E *Staphylococcus aureus* /
Jéssica Oliveira e Nogueira. - 2019.

111 p. : il.

Orientador(a): Maria das Graças Cardoso.

Coorientador(a): Luís Roberto Batista.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Metabólitos secundários. 2. Mecanismo antibacteriano. 3.
Membrana celular. I. Cardoso, Maria das Graças. II. Batista, Luís
Roberto. III. Título.

JÉSSICA OLIVEIRA E NOGUEIRA

**AÇÃO ANTIMICROBIANA DE DIFERENTES TERPENOS E
FENILPROPANOIDES EM *Escherichia coli* E *Staphylococcus aureus***

**ANTIMICROBIAL ACTION OF DIFFERENT TERPENES AND
PHENYLPROPANOIDS IN *Escherichia coli* AND *Staphylococcus aureus***

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 obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 08 de março de 2019.

Dra. Maria das Graças Cardoso – UFLA

Dr. Luís Roberto Batista – UFLA

Dra. Juliana de Fátima Sales – IFG

Dra. Bárbara Sayuri Belleite – UFLA

Profa. Dra. Maria das Graças Cardoso
Orientadora

Prof. Dr. Luís Roberto Batista
Coorientador

**LAVRAS – MG
2019**

A Deus, por ser meu amparo e minha força.

À Nossa Senhora Aparecida, por todas as graças concedidas.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo.

À minha família, pelo apoio.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida.

À Universidade Federal de Lavras, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela oportunidade e suporte financeiro.

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria das Graças Cardoso, pela orientação, apoio e suporte para execução dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Luís Roberto Batista, pela coorientação e por ter aberto as portas do Laboratório de Micotoxinas e Micologia de Alimentos para a execução dos experimentos.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e contribuições.

Aos professores, técnicos e pesquisadores do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural da UFLA, por fornecerem equipamentos e suporte técnico para a obtenção das eletromicrografias.

À Rafaela M. Brandão, por toda a paciência e ajuda com as eletromicrografias.

À Karen C. Camargo, por toda a paciência e ajuda com os experimentos.

Aos professores, técnicos, pesquisadores e alunos do Laboratório de Química Orgânica – Óleos essenciais, Laboratório de Controle e Qualidade de Aguardente, Laboratório de Micologia e Micotoxina de Alimentos, Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural, pela convivência.

E a todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização do presente trabalho.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

Surto de doenças transmitidas por alimentos são reportados no mundo todo e afetam milhares de pessoas anualmente. Através disso, a comprovação de microrganismos resistentes aos antibióticos comercialmente disponíveis gera a necessidade de desenvolvimento de novos agentes capazes de atuar de forma eficaz no controle desses patógenos. Nesse cenário, os terpenoides e fenilpropanoides se destacam por possuírem grande atividade biológica e amplo espectro de ação. Os objetivos deste estudo foram avaliar o potencial antibacteriano de seis compostos derivados de terpenos e fenilpropanoides (limoneno, β -citronelol, carvona, carvacrol, eugenol e *trans*-cinamaldeído) e investigar o mecanismo de ação desses compostos sobre as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Os padrões foram adquiridos comercialmente. O potencial bacteriostático das amostras foi determinado pela técnica de macrodiluição e o efeito bactericida foi confirmado por plaqueamento. O mecanismo da ação antibacteriana foi estudado baseando-se em ensaios biológicos para verificação do efluxo de íons potássio, diminuição da capacidade de tolerância a sal, extravasamento de conteúdos celulares absorventes em 260 nm e absorção de cristais violeta. A influência dos padrões na morfologia de *E. coli* e *S. aureus* foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Foi observado efeito bacteriostático e bactericida em ambas as espécies, causados pelos compostos carvona, carvacrol, eugenol e *trans*-cinamaldeído; entretanto, os terpenos β -citronelol e limoneno apresentaram atividade antibacteriana apenas sobre *S. aureus*. Nenhum dos compostos testados provocou a efusão de potássio das células bacterianas. Foi constatada redução na tolerância a sal para as cepas de *E. coli* tratada com carvacrol e *S. aureus* tratada com β -citronelol. Os padrões carvona e *trans*-cinamaldeído aumentaram a capacidade de tolerância a sal de *S. aureus*. O extravasamento de materiais celulares nos dois microrganismos empregados foi induzido pelos tratamentos com carvona, carvacrol, eugenol e *trans*-cinamaldeído. Por sua vez, o β -citronelol não pareceu afetar a liberação de conteúdos absorventes de *S. aureus*. A absorção de cristal violeta por *E. coli* sofreu aumento significativo após incubação com os padrões, ao passo que as células de *S. aureus* tratadas exibiram leve diminuição na porcentagem de corante absorvido. As imagens obtidas por MEV demonstram as alterações morfológicas ocasionadas nos microrganismos pelos compostos avaliados. Não foi observado rompimento da membrana celular. Conclui-se que os padrões carvona, carvacrol, eugenol e *trans*-cinamaldeído apresentaram atividade biológica sobre *E. coli* e *S. aureus*, e β -citronelol possui potencial antibacteriano apenas sobre *S. aureus*. O mecanismo de ação desses monoterpenos e fenilpropanoides parece envolver alterações na permeabilidade da membrana, seja de forma direta, seja indireta; no entanto, sem resultar na lise celular.

Palavras-chave: Metabólitos secundários. Mecanismo antibacteriano. Membrana celular.

ABSTRACT

Outbreaks of foodborne diseases are reported worldwide and affect thousands of people annually. The existence of microorganisms that are resistant to commercially available antibiotics generates the need to develop new agents capable of acting effectively in the control of these pathogens. In this scenario, the terpenoids and phenylpropanoids stand out because they have great biological activity and a broad spectrum of action. The objective of this study was to evaluate the antibacterial potential of six compounds derived from terpenes and phenylpropanoids (limonene, β -citronellol, carvone, carvacrol, eugenol and trans-cinnamaldehyde) and to investigate the mechanism of action of these compounds against the *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* bacteria. Standards were purchased commercially. The bacteriostatic potential of the samples was determined by the macrodilution technique, and the bactericidal effect was confirmed by plating. The mechanism of the antibacterial action was studied on the basis of biological assays to verify the efflux of potassium ions, the decrease in the capacity for salt tolerance, extravasation of absorbent cellular contents in 260 nm and the absorption of crystal violet. The influence of the patterns on the morphology of *E. coli* and *S. aureus* was analyzed by scanning electron microscopy (SEM). Bacteriostatic and bactericidal effects were observed in both species, caused by the compounds carvone, carvacrol, eugenol and trans-cinnamaldehyde; however, the β -citronellol and limonene terpenes presented antibacterial activity only against *S. aureus*. None of the compounds tested caused potassium effusion from bacterial cells. A decrease in salt tolerance was observed for strains of *E. coli* treated with carvacrol and for *S. aureus* treated with β -citronellol. The carvone and trans-cinnamaldehyde standards increased the salt tolerance of *S. aureus*. The extravasation of cellular materials from the two microorganisms was induced by treatments with carvone, carvacrol, eugenol and trans-cinnamaldehyde. In turn, β -citronellol did not appear to affect the release of absorbent contents from *S. aureus*. Absorption of crystal violet by *E. coli* increased significantly after incubation with standards, whereas a slight decrease was observed for treated *S. aureus* cells. The images obtained by MEV demonstrate the morphological alterations caused in the microorganisms by the evaluated compounds. No rupture of the cell membrane was observed. It was concluded that the carvone, carvacrol, eugenol and trans-cinnamaldehyde standards presented biological activity against *E. coli* and *S. aureus*, and β -citronellol has an antibacterial potential only against *S. aureus*. The mechanism of action of these monoterpenes and phenylpropanoids seems to involve changes in membrane permeability, either directly or indirectly, but without resulting in cell lysis.

Keywords: Secondary metabolites. Antibacterial mechanism. Cell membrane.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Principais fatores que podem influenciar a produção de metabólitos secundários nas plantas.....	18
Figura 2 – Ciclo biossintético dos metabólitos secundários.....	19
Figura 3 – Esquema geral da biossintese de terpenoides.....	22
Figura 4 – Mecanismo de formação das unidades isoprênicas isopentenil difosfato (IPP) e dimetilalil difosfato (DMAPP), pela via do mevalonato.	23
Figura 5 – Formação dos intermediários geranil, nerolil e linalil difosfato, para biossintese dos monoterpêneos.....	25
Figura 6 – Formação dos mircanos e mentanos.	26
Figura 7 – Formação de sesquiterpenos a partir do geranil difosfato.....	27
Figura 8 – Biossintese do IPP via DXPS.....	28
Figura 9 – Biossintese do limoneno a partir do intermediário linalil difosfato.....	30
Figura 10 – Biossintese da carvona a partir do limoneno.....	30
Figura 11 – Biossintese do β -citronelol a partir do geranil difosfato.	31
Figura 12 – Biossintese do carvacrol a partir do intermediário linalil difosfato.	32
Figura 13 – Biossintese de fenilpropanoides.....	33
Figura 14 – Biossintese do <i>trans</i> -cinamaldeído a partir do ácido cinâmico.....	35
Figura 15 – Biossintese do eugenol a partir do ácido <i>p</i> -cumárico.....	36
Figura 16 – Possíveis alvos celulares da ação antibacteriana de óleos essenciais.	44
Figura 17 – Aspecto geral e estrutura da parede celular de <i>Escherichia coli</i>	47
Figura 18 – Aspecto geral e estrutura da parede celular de <i>Staphylococcus aureus</i>	49
Figura 19 – Representação dos diferentes alvos celulares da ação de antibióticos sintéticos.....	51
Figura 20 – Esquema da metodologia para o preparo dos isolados.....	53
Figura 21 – Esquema simplificado da metodologia empregada para análise MALDI-TOF..	54
Figura 22 – Esquema simplificado do teste de macrodiluição em caldo.....	55
Figura 23 – Esquema da metodologia para determinação da CMB.	56
Figura 24 – Esquema da metodologia empregada para avaliação de efluxo de potássio.	57
Figura 25 – Esquema da metodologia para avaliação da capacidade de tolerância a sal.	58
Figura 26 – Esquema da metodologia para avaliar a liberação de conteúdos celulares.....	59
Figura 27 – Esquema da metodologia de absorção de cristal violeta.....	60
Figura 28 – Esquema simplificado da metodologia de preparo das amostras para MEV.	62

Figura 29 – Resultados para os ensaios biológicos de CMB do antibiótico cloranfenicol. ...	64
Figura 30 – Comparação entre CMI e CMB dos padrões com maior potencial antibacteriano em <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	65
Figura 31 – Estrutura química dos padrões testados e do cloranfenicol.	67
Figura 32 – Esquema de um provável mecanismo de ação antibacteriano para o carvacrol.	70
Figura 33 – Ensaio biológico de tolerância à sal de <i>E. coli</i>	74
Figura 34 – Ensaio biológico de tolerância à sal de <i>S. aureus</i>	75
Figura 35 – Dendrograma de similaridade entre os tratamentos pelo teste de tolerância a sal.....	77
Figura 36 – Liberação de constituintes celulares de <i>E. coli</i>	79
Figura 37 – Liberação de constituintes celulares de <i>E. coli</i> induzida por carvacrol.	79
Figura 38 – Liberação de constituintes celulares de <i>E. coli</i> induzida por <i>trans</i> - cinamaldeído.....	80
Figura 39 – Liberação de constituintes celulares de <i>E. coli</i> induzida por eugenol.....	80
Figura 40 – Liberação de constituintes celulares de <i>E. coli</i> induzida por carvona.....	81
Figura 41 – Liberação de constituintes celulares de <i>S. aureus</i>	81
Figura 42 – Liberação de constituintes celulares de <i>S. aureus</i> induzida por carvacrol.	82
Figura 43 – Liberação de constituintes celulares de <i>S. aureus</i> induzida por <i>trans</i> - cinamaldeído.....	82
Figura 44 – Liberação de constituintes celulares de <i>S. aureus</i> induzida por eugenol.	83
Figura 45 – Liberação de constituintes celulares de <i>S. aureus</i> induzida por carvona.....	83
Figura 46 – Liberação de constituintes celulares de <i>S. aureus</i> induzida por β -citronelol.	84
Figura 47 – Estrutura química do cristal violeta.	85
Figura 48 – Ensaio de absorção de cristal violeta por <i>E. coli</i>	86
Figura 49 – Ensaio de absorção de cristal violeta por <i>S. aureus</i>	86
Figura 50 – Dendrograma para avaliação geral do comportamento das amostras.	88
Figura 51 – Eletromicrografias de <i>E. coli</i>	89
Figura 52 – Eletromicrografias de <i>S. aureus</i>	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Identificação dos microrganismos por MALDI-TOF.....	54
Tabela 2 – Fatores de diluição para os tratamentos.....	59
Tabela 3 – Concentração mínima inibitória e bactericida das amostras.....	63
Tabela 4 – Registros bibliográficos de concentração mínima inibitória para os padrões com maior atividade antibacteriana.....	65
Tabela 5 – Liberação de íons potássio (em mg L ⁻¹) em <i>E. coli</i> em diferentes horários de incubação.....	69
Tabela 6 – Liberação de íons potássio (em mg L ⁻¹) em <i>S. aureus</i> em diferentes horários de incubação.....	69
Tabela 7 – Influência dos padrões na capacidade de tolerância a sal de <i>E. coli</i>	72
Tabela 8 – Influência dos padrões na capacidade de tolerância a sal de <i>S. aureus</i>	73
Tabela 9 – Ensaio de absorção de cristal violeta.....	85

LISTA DE SIGLAS

a.C.	Antes de Cristo
ADP	Adenosina difosfato
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosina trifosfato
BHI	Brain-Heart Infusion (Infusão de cérebro e coração)
BOD	Biochemical Oxygen Demand (Demanda biológica de oxigênio)
°C	Graus Celsius
CMI	Concentração mínima inibitória
CMB	Concentração mínima bactericida
CMP	Citidina monofosfato
CoA	Coenzima A
CTP	Citidina trifosfato
CV	Cristal violeta
DMAP	Dimetilalil difosfato
DMSO	Dimetilsufóxido
DNA	Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
DTAs	Doenças Transmitidas por Alimentos
DXPS	1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato
EPEC	Enteropatogênico
ETEC	Enterotoxigênico
EIEC	Enteroinvasor
EHEC	Enterohemorrágico
EPSP	Ácido 3-fosfato-3-enolpiruvilchiquímico sintase
FDA	Food and Drug Administration
g	Gramas
g	Gravidade
GPP	Geranil difosfato
GRAS	Generally Recognized as Safe (Geralmente reconhecido como seguro)
H	horas
HCA	Hierarchical Clustering Analysis (Análise de agrupamento hierárquico)
HMG-CoA	β -hidroxi- β -metilglutaril-Coenzima A

IPP	Isopentenil difosfato
ISO	International Standard Organization
L	litros
LPP	Linalil difosfato
MALDI-TOF MS	Matrix-assisted laser desorption/ionization – time-of-flight mass spectrometry (Ionização/dessorção a laser assistida por matriz – tempo de voo e espectrômetro de massas)
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
Mg	Miligramas
MH	Mueller-Hinton
mL	Mililitros
mm	Milímetros
NAD	Nicotinamide adenine dinucleotide (Dinucleotídeo de adenina nicotinamida)
NADP	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida)
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
nm	Nanômetros
NPP	Nerolil difosfato
OEs	Óleos essenciais
PBS	Phosphate buffered saline (Tampão Fosfato Salino)
pH	Potencial hidrogeniônico
Pi	Fosfato inorgânico
QS	Quorum sensing (sensor de quórum)
RNA	Ribonucleic acid (Ácido ribonucleico)
TSB	Tryptic Soy Both (Caldo de soja triptica)
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
µg	Microgramas
µL	Microlitros

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1	Breve histórico do uso e importância dos derivados vegetais.....	15
2.2	Metabolismo vegetal.....	16
2.3	Óleos essenciais e seus constituintes.....	20
2.3.1	Biossíntese de terpenos.....	21
2.3.1.1	Biossíntese do limoneno.....	29
2.3.1.2	Biossíntese da carvona.....	30
2.3.1.3	Biossíntese do β -citronelol.....	30
2.3.1.4	Biossíntese do carvacrol.....	31
2.3.2	Biossíntese de fenilpropanoides.....	32
2.3.2.1	Biossíntese do <i>trans</i> -cinamaldeído.....	35
2.3.2.2	Biossíntese do eugenol.....	36
2.4	Potencialidades biológicas dos monoterpenos e fenilpropanoides.....	37
2.4.1	Atividade antibacteriana dos monoterpenos e fenilpropanoides.....	39
2.5	Contaminação alimentar.....	44
2.5.1	Doenças Transmitidas por Alimentos.....	45
2.5.2	<i>Escherichia coli</i>	46
2.5.3	<i>Staphylococcus aureus</i>	48
2.6	Antibióticos sintéticos e resistência bacteriana.....	50
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	52
3.1	Padrões utilizados.....	52
3.2	Ensaio biológico.....	52
3.2.1	Microrganismos.....	52
3.2.2	Determinação da pureza das cepas.....	53
3.2.3	Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) dos padrões em <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	54
3.2.4	Determinação da concentração mínima bactericida (CMB) dos padrões em <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	55
3.2.5	Avaliação da liberação de íons potássio por <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	56

3.2.6	Avaliação da capacidade de tolerância a sal de <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	57
3.2.7	Avaliação da liberação de constituintes celulares por <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	58
3.2.8	Avaliação da permeabilidade da membrana de <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	59
3.2.9	Avaliação morfológica de <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	61
3.3	Análise estatística	62
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
4.1	Avaliação da concentração mínima inibitória e bactericida dos terpenos e fenilpropanoides (padrões) sobre <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	63
4.2	Avaliação da influência dos padrões na liberação de íons potássio por <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	68
4.3	Avaliação da influência dos padrões na capacidade de tolerância a sal de <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	71
4.4	Avaliação da influência dos padrões na liberação de constituintes celulares em <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	77
4.5	Avaliação da influência dos padrões na permeabilidade da membrana celular de <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	84
4.6	Avaliação das alterações morfológicas induzidas pelos padrões em <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	89
5	CONCLUSÕES	94
	REFERÊNCIAS	95
	APÊNDICE	103

1 INTRODUÇÃO

A resistência microbiana é um dos mais graves problemas da saúde pública mundial. A ineficácia de alguns antibióticos existentes gera necessidade de desenvolvimento de novas drogas capazes de controlar a proliferação de patógenos, sem causar efeitos tóxicos ao homem.

O quadro se complica com o aumento do número de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs). Dentre os microrganismos de interesse, as bactérias prevalecem como responsáveis pelo maior número de casos de DTAs no Brasil e no mundo. Nos últimos anos, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* causaram centenas de surtos de intoxicação alimentar, atingindo milhares de pessoas (BRASIL, 2019).

Além dos danos ao consumidor e à saúde pública, a contaminação de alimentos gera prejuízos às indústrias alimentícias, prejudicando a economia, uma vez que produtos deteriorados e insalubres não são comercializados e resultam em multas ou recolhimento de lotes em más condições.

Como alternativa para o controle desses patógenos, pesquisadores têm recorrido a produtos naturais e bons resultados são obtidos na inibição do desenvolvimento de diferentes microrganismos. Dentre as substâncias sintetizadas pelas plantas, citam-se os óleos essenciais, oriundos de rotas biossintéticas pertencentes ao metabolismo secundário vegetal. Os óleos essenciais são constituídos de misturas complexas de substâncias derivadas de terpenos e fenilpropanoides. Esses compostos se destacam devido à sua versatilidade e ampla gama de atuação biológica, apresentando características antimicrobiana, antioxidante, anticoagulante, herbicida, inseticida, antitumoral, antiviral, dentre outras (SIMÕES et al., 2007).

Atualmente, muito tem se investigado a respeito da aplicação de óleos essenciais como antimicrobianos naturais para a conservação de alimentos (como nos trabalhos de Brnawi et al. (2018) e Souza et al. (2019)). No entanto, os mecanismos antibacterianos de ação de vários compostos terpênicos e fenilpropanoides ainda não estão bem elucidados.

Objetivou-se, no presente estudo, avaliar o potencial antibacteriano de diferentes monoterpenos e fenilpropanoides (limoneno, carvona, β -citronelol, carvacrol, eugenol e *trans*-cinamaldeído) e investigar o mecanismo de atuação baseado em alterações nas membranas bacterianas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Breve histórico do uso e importância dos derivados vegetais

O homem sempre buscou na natureza meios para garantir sua sobrevivência. O uso de espécies vegetais está intimamente relacionado à trajetória da humanidade, seja como fonte de alimentos, seja como medicamentos ou matéria-prima para produtos que garantam a comodidade no dia a dia.

A exploração de plantas com propriedades medicinais se encontra tão enraizada na história que se verificam, em relatos arqueológicos de 11.000 anos a.C., a utilização de espécies psicoativas na região de Timor, Indonésia. Na China, no ano de 2.735 a.C., o Imperador Shen Nung compilou o *Pent'sao Kang*, na qual estão listados cerca de 365 medicamentos e 600 espécies vegetais, como a genciana-amarela (*Gentia lutea*), ginseng (*Panax ginseng*), canela (*Cinnamomum sp.*) e efedra (*Ephedra sinica* Stapf.), utilizados até hoje devido às suas propriedades biológicas (ROCHA et al., 2015; SEWELL; RAFIEIAN-KOPAEI, 2014).

Além das aplicações medicinais, as plantas originaram as primeiras preparações inseticidas. O tabaco (*Nicotiana sp.*), as flores de sabugueiro (*Sambucus nigra*) e o absinto (*Artemisia absinthium*), por exemplo, têm sido exploradas há centenas anos por suas propriedades pesticidas. Há indícios de que na Índia (2.000 a.C.) e no Egito antigo, já se utilizavam derivados vegetais no preparo de inseticidas botânicos para o controle de pragas em grãos armazenados (MOREIRA et al., 2006; OBEREMOK et al., 2015).

Outro registro histórico importante é o *papiro de Ebers* (datado de 1.550 a.C.). Esse documento retrata parte dos conhecimentos médicos do antigo Egito e cataloga aplicações para espécies, como a papoula (*Papaver somniferum* L.), maconha (*Cannabis sativa* L.), mirra (*Commiphora myrrha* (T. Nees) Engl.), sena (*Sena alexandrina* Mill.) e babosa (*Aloe vera* (L.) Burm. f). No entanto, é na Grécia antiga (1.100 a.C. – 146 a.C.) que se formalizaram conceitos importantes de medicina. Os estudiosos gregos Teophrastus e Dioscórides descrevem em suas obras (*História das Plantas* e *De Materia Medica*, respectivamente) mais de mil espécies e drogas de origem vegetal (ROCHA et al., 2015).

Já na América, plantas como ipecacuanha (*Cephaelis ipecacuanha* (Brot.) Tussac), quina (*Chincona sp.*) e coca (*Erythroxylum coca* Lam.), dentre outras, eram amplamente empregadas no tratamento de doenças em diversas culturas Pré-Colombianas, em especial a Asteca, Maia, Olmeca e Tolteca. No Brasil, povos indígenas beneficiavam-se de espécies vegetais na alimentação, no tratamento de doenças e até mesmo em aplicações cosméticas.

Algumas ervas utilizadas na medicina indígena são relatadas na obra de Gabriel Soares de Souza, denominada “Tratado Descritivo do Brasil”. Entretanto, foram os jesuítas os principais precursores para a elaboração de uma Farmacopeia Brasileira. Em suas expedições missionárias, os Padres jesuítas registravam os conhecimentos indígenas e elaboravam suas próprias prescrições e medicamentos a partir de suas observações, comercializando os fármacos obtidos de plantas brasileiras em todo o Império Português. Espécies como *Antirhea borbonica* (quina), *Solanum paniculatum* (jurubeba), *Senna occidentalis* (fedegoso), *Angelica arcahngelica* (angélica), por exemplo, foram aplicadas em formulações conhecidas por “Água Febrífuga” e “*Triaga Brasilica*” (ROCHA et al., 2015).

No século XIX, com os avanços científicos, delineou-se a concepção dos medicamentos conhecidos atualmente. O pioneiro foi Friedrich Serturmer, que isolou morfina da papoula em 1806. Anos depois, dois alcaloides com propriedades biológicas também foram identificados na mesma espécie: a codeína (isolada em 1824, agente antitussígeno) e a papaverina (1848, agente antiespasmódico). Entretanto, um marco histórico da indústria farmacêutica foi a descoberta da salicina em 1932, extraída do salgueiro (*Salix alba*). Devido às propriedades analgésica e antipirética da salicina, em 1839 realizou-se a primeira modificação em sua estrutura para empregar esse composto em tratamentos de artrite, originando o ácido salicílico. A aspirina (ácido acetilsalicílico) foi sintetizada em 1897 a partir do ácido salicílico, despontando como a primeira patente no mercado farmacêutico (DUTRA et al., 2016).

2.2 Metabolismo vegetal

Os avanços tecnológicos possibilitaram o desenvolvimento de medicamentos para cura e tratamento de doenças que até décadas atrás não eram conhecidos, além de aumentar o arsenal de conservantes, antioxidantes, aditivos, herbicidas, pesticidas, cosméticos, antibióticos e fármacos diversos. A maioria desses produtos são sintetizados com base em substâncias isoladas de vegetais (os denominados princípios ativos), podendo ser iguais aos compostos originais, ou com alterações em sua estrutura, a fim de maximizar sua atividade (NEWMAN; CRAGG, 2016).

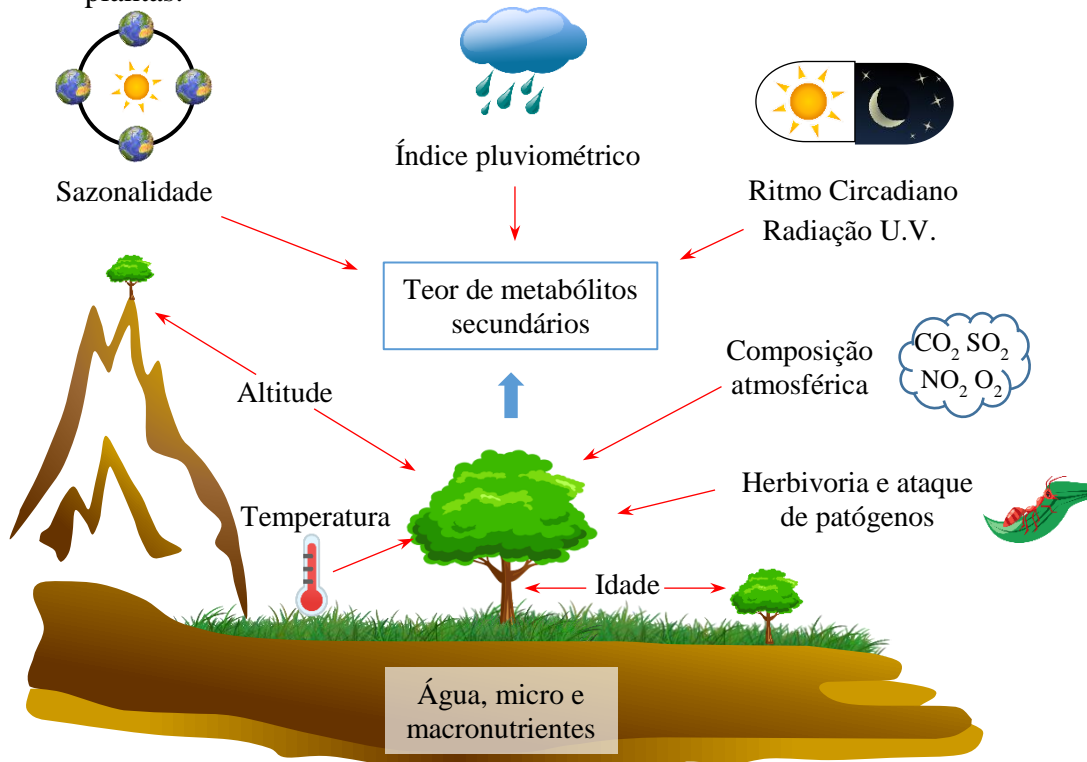
Muitas plantas produzem e armazenam substâncias com características peculiares que lhes conferem variada bioatividade. Esses compostos podem ser oriundos do metabolismo primário ou secundário, e são utilizados pela planta para a manutenção da vida (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

O metabolismo é o conjunto de reações que ocorrem nas células vivas. Essas reações consistem em síntese, quebra ou transformações de moléculas orgânicas catalisadas por enzimas e, em geral, têm a finalidade de prover energia para o organismo. O metabolismo primário é responsável pela formação de proteínas, lipídeos, carboidratos, ácidos nucleicos e outras substâncias de importância para a realização das funções vitais do indivíduo; sendo assim, comum a todos os seres vivos (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

As plantas e outros seres vivos, como os fungos, por exemplo, sintetizam substâncias específicas pertencentes a um conjunto de reações denominado metabolismo secundário. Esses compostos aparentemente não estão envolvidos com a geração de energia ou desenvolvimento do organismo; contudo, atuam em funções indispensáveis para as interações ecológicas entre as espécies vegetais e o meio ambiente. Manutenção da umidade, efeitos alelopáticos, atração de polinizadores e dispersores de sementes, proteção contra predadores, infecções microbianas ou raios ultravioletas são alguns dos papéis desempenhados pelos metabólitos secundários (PEREIRA; CARDOSO, 2012; SIMÕES et al., 2007).

Segundo Gobbo-Neto e Lopes (2007), a manutenção do metabolismo secundário é afetada por fatores externos à planta, tais como sazonalidade, temperatura, disponibilidade hídrica, incidência de radiação ultravioleta, viabilidade de nutrientes, altitude, ataque de patógenos ou parasitas, estímulos mecânicos depredativos e/ou poluição atmosférica (FIGURA 1). Os efeitos ambientais exercidos sobre os organismos podem causar alterações na quantidade e qualidade dos metabólitos produzidos, resultando em modificações na expressão gênica com o passar dos anos e processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos.

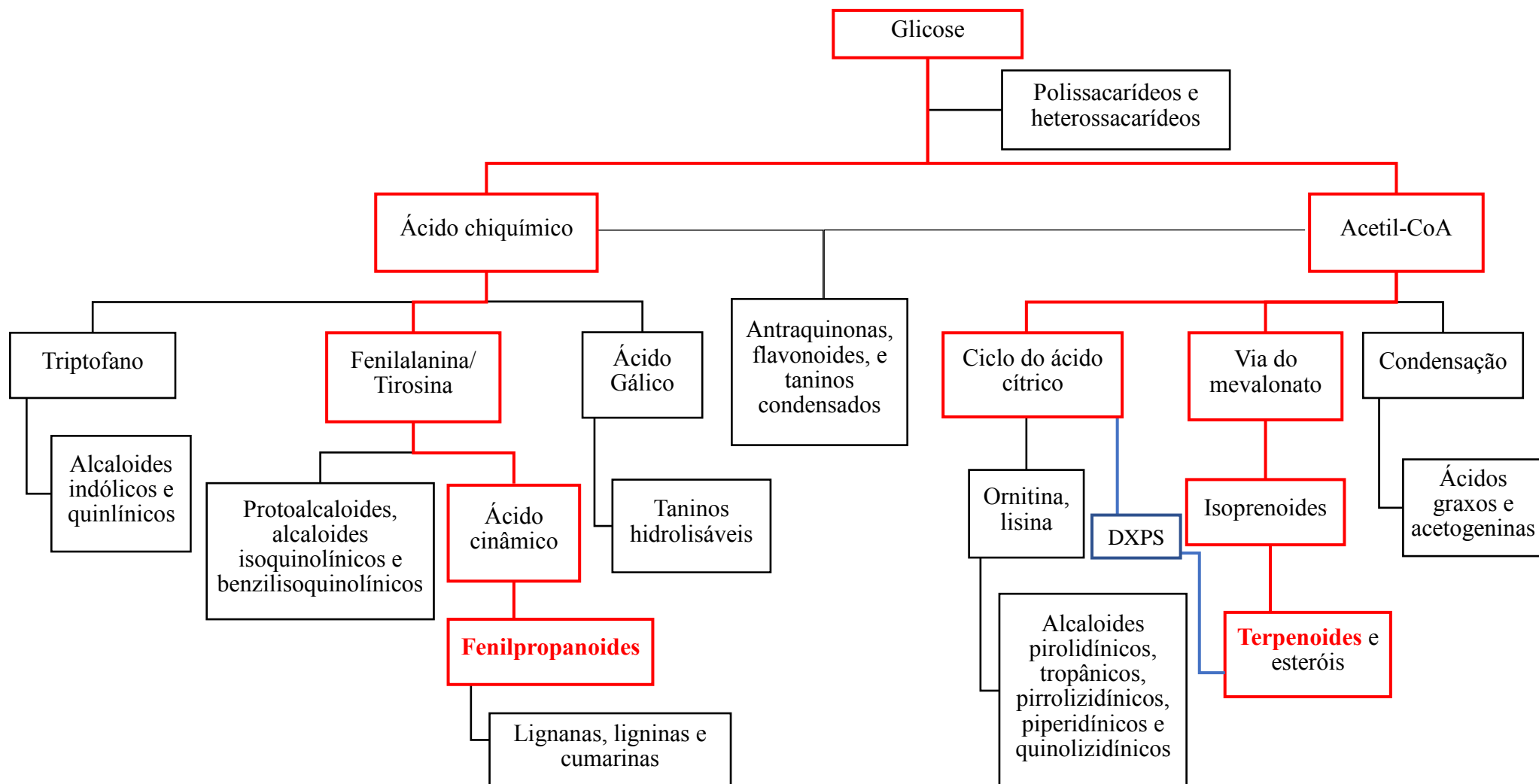
Figura 1 – Principais fatores que podem influenciar a produção de metabólitos secundários nas plantas.



Fonte: Adaptado de Gobbo-Neto e Lopes (2007).

A principal diferença entre os metabólitos vegetais primários e secundários é que estes últimos geralmente apresentam baixo peso molecular, encontram-se em pequenas concentrações nas plantas e se destacam por exibir propriedades biológicas variadas. Dentre os metabólitos secundários, citam-se os taninos, saponinas, cumarinas, lactonas, alcaloides, flavonoides, antocianinas, ligninas, lignanas, antraquinonas, óleos essenciais e outros (FIGURA 2) (SIMÕES et al., 2007).

Figura 2 – Ciclo biossintético dos metabólitos secundários.



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

O precursor básico dos metabólitos secundários é a glicose. O catabolismo da glicose pela rota do ácido chiquímico origina taninos hidrolisáveis, cumarinas, alcaloides derivados de aminoácidos aromáticos e fenilpropanoides. Em contrapartida, via acetil-coenzima A (acetil-CoA), a glicose dará origem aos aminoácidos alifáticos e alcaloides derivados deles, terpenoides, esteroides, ácidos graxos e triglicerídeos. Alguns metabólitos secundários derivam de ambos os intermediários, como é o caso das antraquinonas, flavonoides e taninos condensados, os quais resultam da combinação de uma unidade de ácido chiquímico e uma ou mais unidades de acetato ou derivados (PEREIRA; CARDOSO, 2012; SIMÕES et al., 2007).

2.3 Óleos essenciais e seus constituintes

O termo óleo essencial foi empregado pela primeira vez por Paracelsus, no século XVI, que designava esses compostos como a “*quinta essentia*” da planta. Os óleos essenciais são um grupo especial de metabólitos secundários, formados por misturas complexas de substâncias derivadas de fenilpropanoides e terpenos, que podem variar desde álcoois, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, até constituintes com enxofre. Também chamados de óleos voláteis, etéreos ou essências, são compostos lipofílicos, geralmente odoríferos, voláteis e líquidos, incolores ou ligeiramente amarelados. Os óleos essenciais apresentam diversas atividades biológicas, tais como: antitumoral, antioxidante, antimicrobiana, inseticida, antiofídica, antiprotozoária, antiviral, alelopática, repelente, dentre outras (SAKKAS; PAPADOPOULOU, 2017; SIMÕES et al., 2007).

A International Standard Organization (ISO 9235: 2013) define “óleo essencial” como produto obtido de matéria-prima de origem vegetal, após a separação da fase aquosa (se houver) por processos físicos; extraído por destilação a vapor (com ou sem adição de água ao destilador), prensagem a frio (epicarpos de frutos cítricos) ou destilação seca (madeira, cascas, raízes ou gomas) (INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION, 2013).

Anteriormente, registros históricos do uso de plantas foram citados neste trabalho (item 2.1). Além de preparos medicinais com extratos vegetais, outras formas na qual as plantas eram empregadas no Oriente envolvia o preparo de unguentos e pomadas à base de óleos essenciais. Os egípcios, por exemplo, exploravam os recursos naturais, em especial os óleos voláteis, em formulações de pomadas terapêuticas, cosméticos, artigos de perfumaria ou conservantes de cadáveres (ALMEIDA, 2016).

Na Babilônia, em 1.800 a.C., o uso de óleos essenciais, sobretudo de cedro (*Cedrus sp.*), era corriqueiro nos cuidados com a saúde. Incorporando os conhecimentos babilônios, egípcios

e persas, a cultura grega dispunha de práticas terapêuticas que envolviam a aplicação de essências de romã (*Punica granatum*), gengibre (*Zingiber officinale*), hortelã (*Mentha* sp.), entre outros. Hipócrates, por exemplo, administrava óleos essenciais sob forma de cataplasma em suas prescrições médicas. Mas, os pioneiros na destilação de plantas aromáticas foram os árabes, que desenvolveram vários processos para extração de óleos essenciais, inclusive técnicas de destilação em larga escala, já na Idade Média (ALMEIDA, 2016).

Atualmente, os óleos essenciais podem ser extraídos por diferentes métodos, dependendo da parte da planta em estudo e da finalidade de aplicação desse óleo. Citam-se a enfloração, arraste por vapor d'água, extração com solventes orgânicos, prensagem ou expressão, hidrodestilação e extração por CO₂ supercrítico. Dentre essas técnicas, as mais empregadas são a hidrodestilação e a destilação por arraste com vapor d'água, uma vez que os produtos gerados apresentam maior pureza. Por utilizar a água como solvente, essas técnicas permitem que os óleos essenciais obtidos sejam aplicados em alimentos, na elaboração de fitoterápicos, cosméticos ou perfumes (SIMÕES et al., 2007).

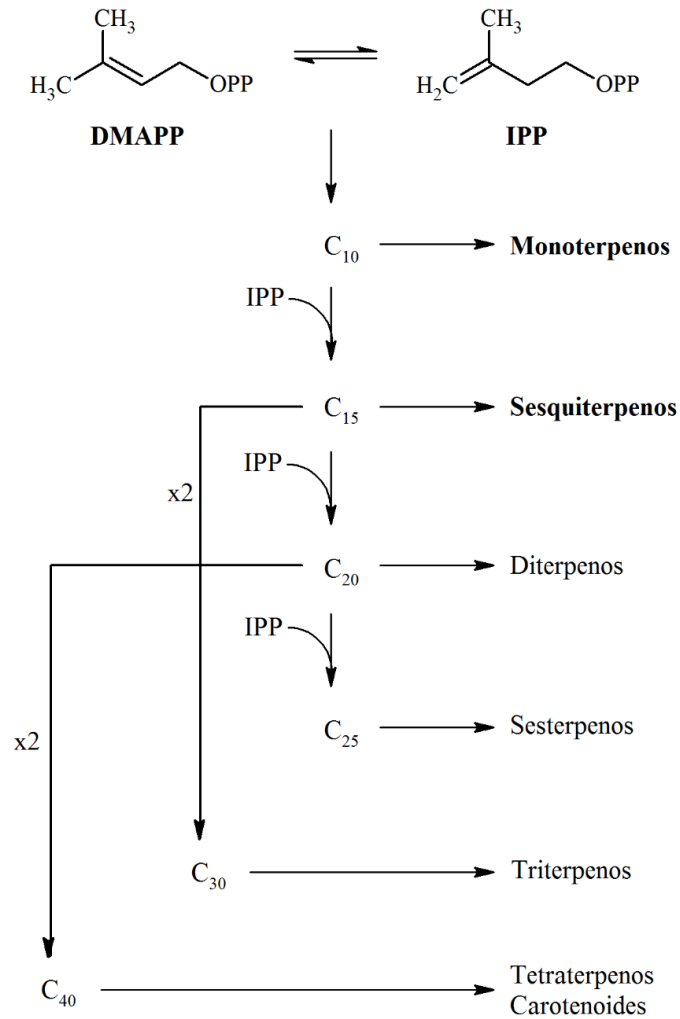
Desde que se descobriram as propriedades dos óleos essenciais, esses produtos vêm sendo pesquisados e aplicados nas mais diversas áreas da indústria. Na indústria agroquímica, por exemplo, os óleos voláteis e seus constituintes isolados são explorados como possíveis princípios ativos para a elaboração de novos repelentes, pesticidas ou herbicidas. Nas indústrias farmacêutica e cosmética, eles são empregados como precursores ou como princípios ativos de medicamentos e produtos de cuidados pessoais. Para a indústria alimentícia, esses metabólitos têm sido visados como conservantes devido à sua capacidade de evitar a rancificação de alimentos e às propriedades antimicrobianas que apresentam, além de conferir sabor e aroma. Na perfumaria, são utilizados para fixação e produção de fragrâncias, dentre outras aplicações (CALO et al., 2015; CARVALHO; ESTEVINHO; SANTOS, 2016; PAVELA; BENELLI, 2016; RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

2.3.1 Biossíntese de terpenos

Os terpenos são constituídos de carbono e hidrogênio, podendo apresentar também oxigênio na cadeia carbônica; nesses casos, são chamados de terpenoides. Os terpenos e terpenoides derivam do isopreno, a partir da rota biossintética do ácido mevalônico. Nessa classe, incluem-se os monoterpenos (10 átomos de carbono), sesquiterpenos (15 átomos de carbono), diterpenos (20 átomos de carbono), sesterpenos (25 átomos de carbonos), triterpenos (30 átomos de carbonos), tetraterpenos (40 átomos de carbonos) e polisoprenoides (FIGURA

3). Os monoterpenos e sesquiterpenos são os compostos encontrados com maior frequência nos óleos essenciais e podem ser subdivididos em três grupos: os acíclicos, monocíclicos ou bicíclicos. Esses metabólitos pertencem a diferentes classes, como hidrocarbonetos insaturados, álcoois, aldeídos, cetonas, lactonas e tropolonas (SIMÕES et al., 2007).

Figura 3 – Esquema geral da biossíntese de terpenoides.



Fonte: Adaptado de Dewick (2009).

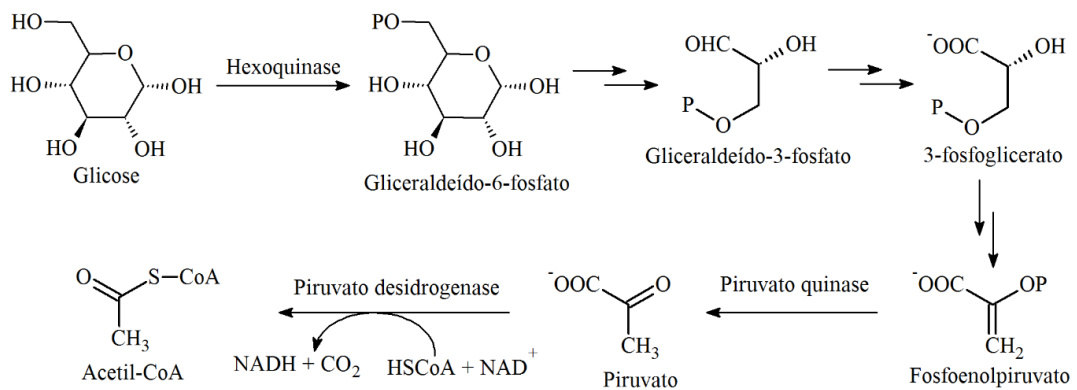
A biossíntese dos terpenos ocorre a partir da glicose. Por meio de uma série de reações do metabolismo primário, a glicose é catabolizada em acetil-coenzima A (acetil-CoA), um tioéster (FIGURA 4), que dará origem aos terpenoides pelas rotas do mevalonato ou do ácido cítrico, via 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXPS) (rotas do metabolismo secundário) (SIMÕES et al., 2007).

Na rota do mevalonato, o ácido mevalônico é formado por uma série de reações, após a condensação de três moléculas de acetil-CoA, conforme representado na Figura 4. Inicialmente,

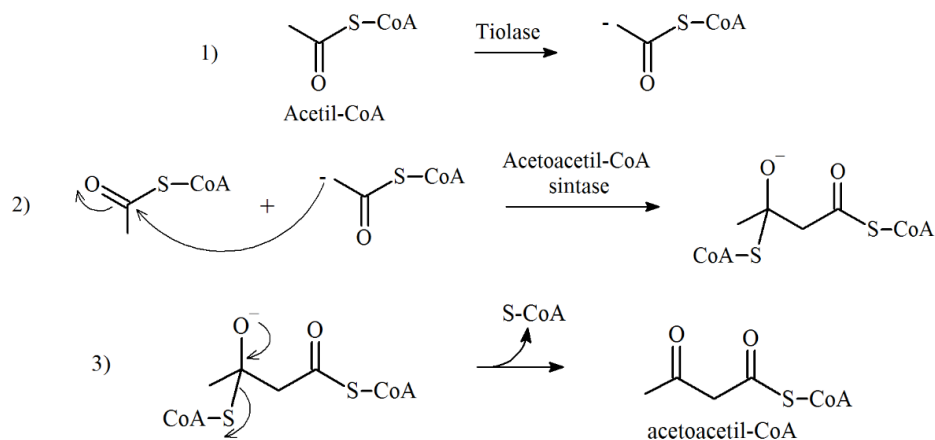
duas moléculas de acetil-CoA formam o acetoacetil-CoA em uma condensação de Claisen. A terceira molécula é incorporada por uma adição aldólica estereoespecífica. A hidrólise de um grupo -SCoA origina o éster β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA (HMG-CoA), que é reduzido a ácido mevalônico numa reação irreversível. Posteriormente, o ácido mevalônico é convertido em isopentenil difosfato (IPP), ou isopreno ativo, unidade básica para formação dos terpenoides. Duas enzimas dependentes de ATP estão envolvidas nessa etapa reacional. A primeira fosforilação do ácido mevalônico ocorre no álcool primário, em seguida, o álcool terciário é fosforilado. Após essas reações, a molécula de ATP facilita a descarboxilação e ocorre a perda de água e gás carbônico, resultando no composto isopentenil difosfato que, por ação de uma isomerase estereoespecífica, interconverte-se em dimetilalil difosfato (DMAPP), isômero favorecido no equilíbrio (DEWICK, 2009; SIMÕES et al., 2007).

Figura 4 – Mecanismo de formação das unidades isoprênicas isopentenil difosfato (IPP) e dimetilalil difosfato (DMAPP), pela via do mevalonato. (Continua)

Formação do Acetil-CoA

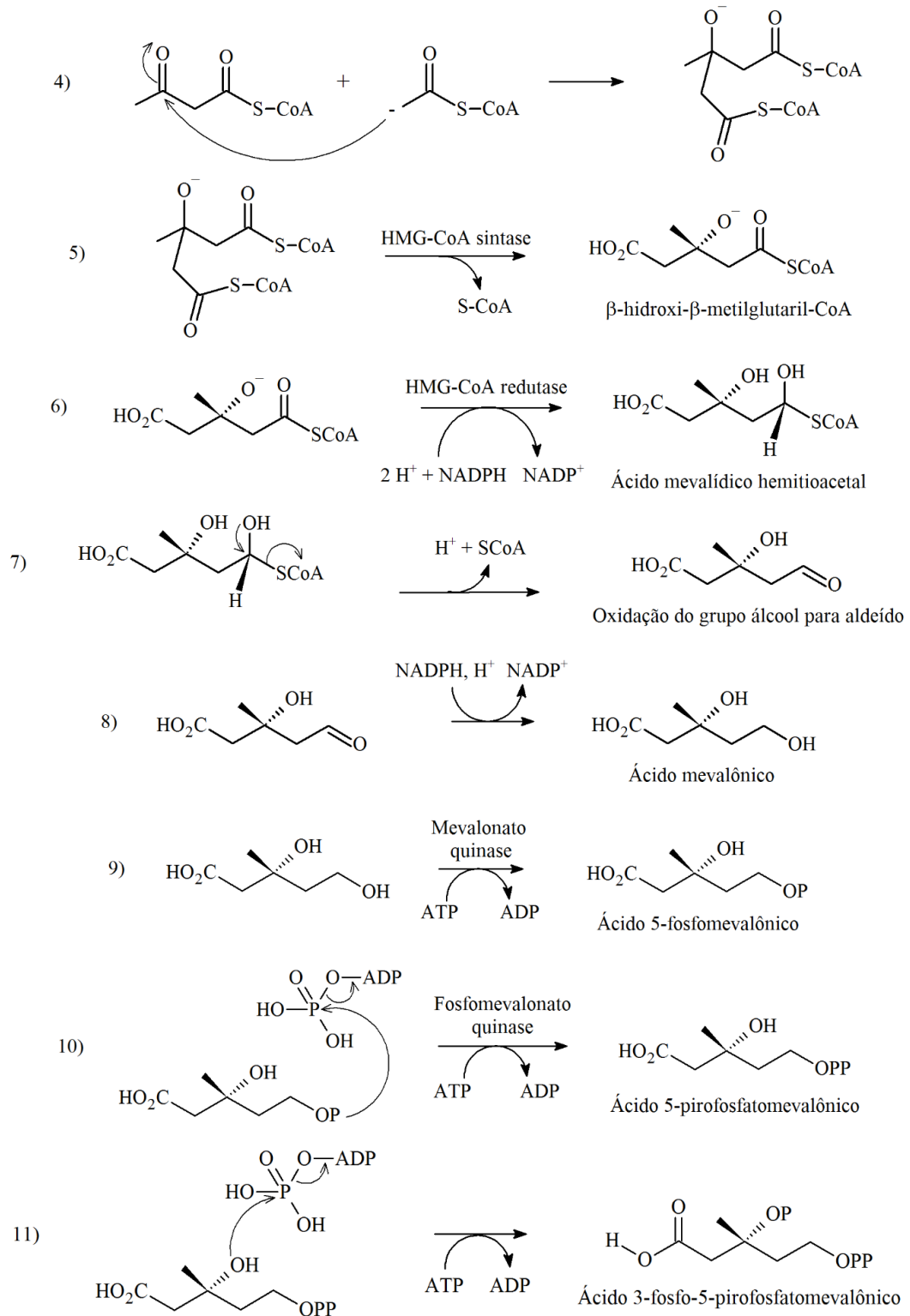


Formação dos terpenos



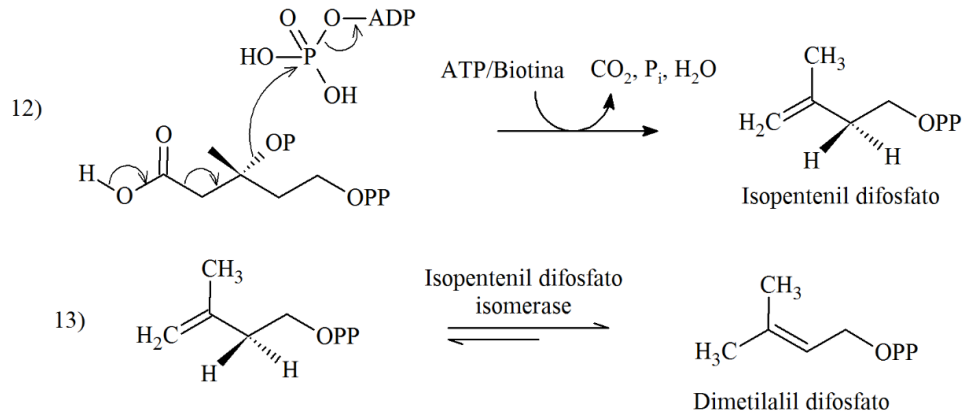
Continua...

Figura 4 – Mecanismo de formação das unidades isoprênicas isopentenil difosfato (IPP) e dimetilalil difosfato (DMAPP), pela via do mevalonato. (Continua)



Continua...

Figura 4 – Mecanismo de formação das unidades isoprênicas isopentenil difosfato (IPP) e dimetilalil difosfato (DMAPP), pela via do mevalonato. (Conclusão)

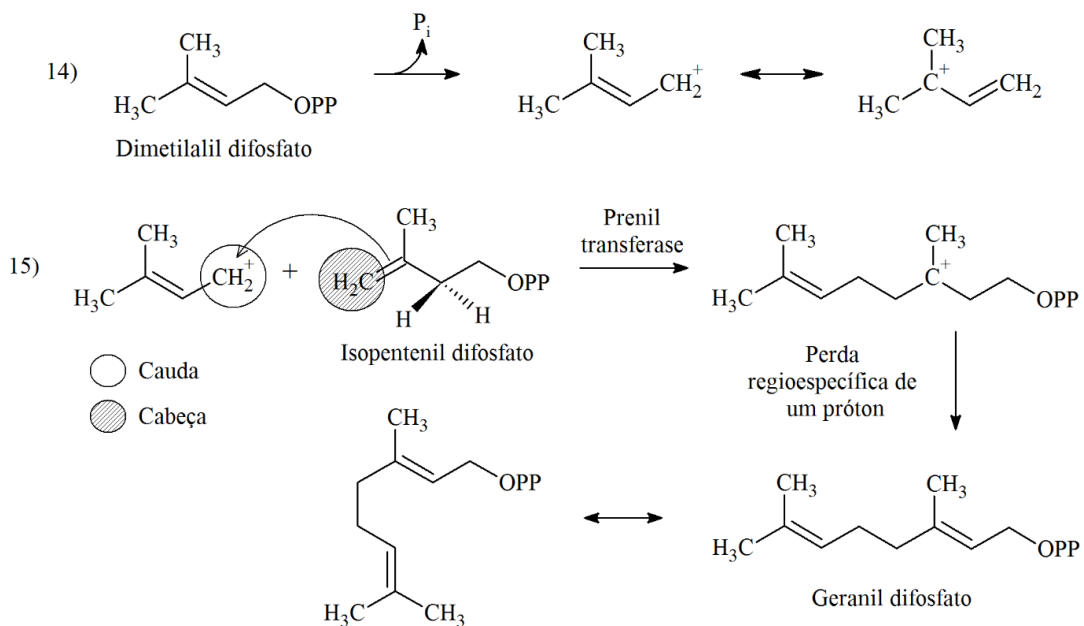


Conclusão.

Fonte: Adaptado de Brahmksatriya, Brahmksatriya (2013); Dewick (2009) e Eisenreich, Rohdich, Bacher (2001).

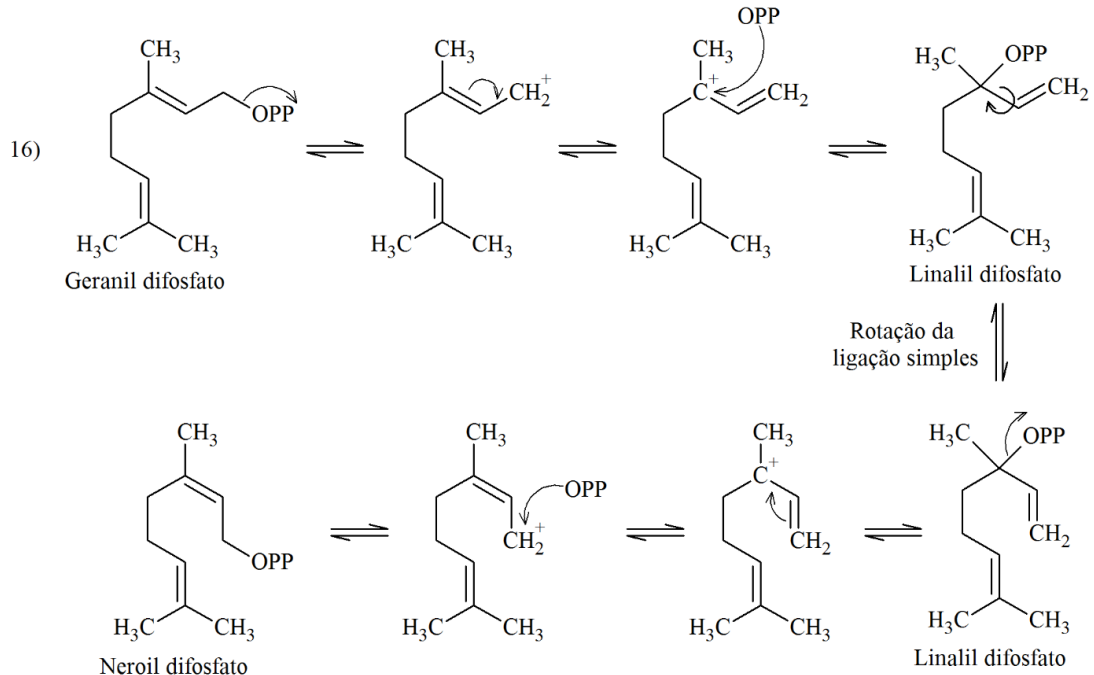
As moléculas de IPP e DMAPP combinam-se em reações do tipo condensação cabeça-cauda, para formar os terpenos a partir dos intermediários geranil (GPP), neroil (NPP) ou linalil (LPP) difosfato, conforme exemplificado na Figura 5. Esse tipo de condensação se inicia com a perda do grupo difosfato ligado à molécula de DMAPP (cauda), formando um carbocátion primário, que se adiciona à molécula de IPP (cabeça) por uma reação enzimática de adição eletrofílica na dupla ligação (SIMÕES et al., 2007).

Figura 5 – Formação dos intermediários geranil, neroil e linalil difosfato, para biossíntese dos monoterpênicos. (Continua)



Continua...

Figura 5 – Formação dos intermediários geranyl, nerolil e linalil difosfato, para biossíntese dos monoterpenos. (Conclusão)

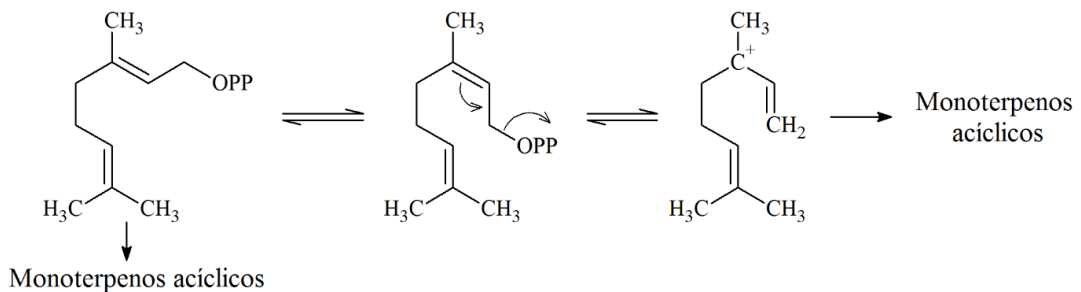


Conclusão.

Fonte: Adaptado de Dewick (2009).

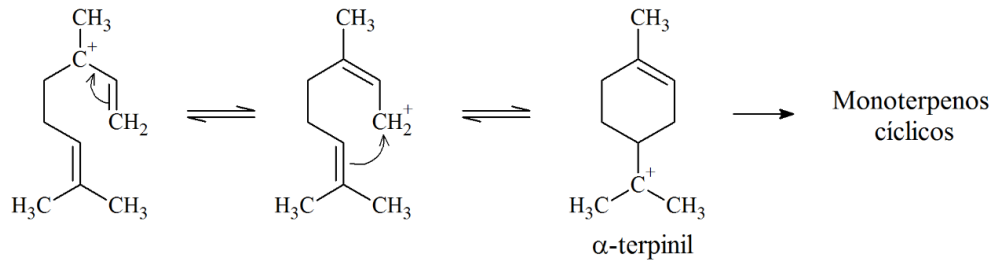
Quando as combinações entre IPP e DMAPP resultam em metabólitos com estrutura de cadeia aberta, provenientes dos intermediários geranyl (GPP), nerolil (NPP) ou linalil difosfato (LPP), são formados os mircanos. Os mentanos, por sua vez, são compostos cíclicos advindos dos intermediários NPP ou LPP (FIGURA 6). A reação de ciclização do linalil ou nerolil para formação do cátion α -terpinil é catalisada por um grupo de enzimas dependentes de metais, denominadas terpeno sintase ou terpeno ciclase (TRINDADE et al., 2018)

Figura 6 – Formação dos mircanos e mentanos. (Continua)



Continua...

Figura 6 – Formação dos mircanos e mentanos. (Conclusão)

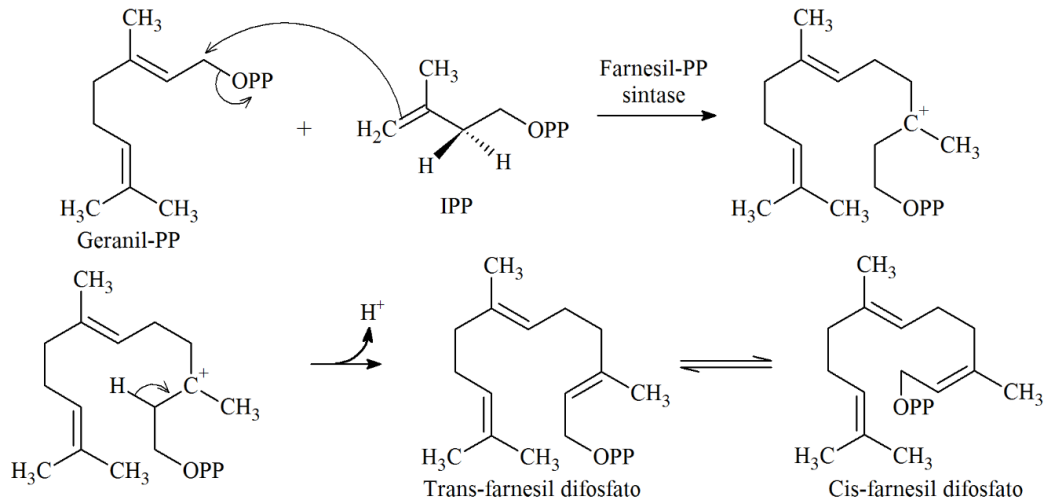


Conclusão.

Fonte: Adaptado de Dewick (2009).

A adição de uma molécula de isopentenil aos intermediários geranil, linalil ou neroil resulta na formação de sesquiterpenos, conforme exemplificado na figura abaixo (DEWICK, 2009).

Figura 7 – Formação de sesquiterpenos a partir do geranil difosfato.



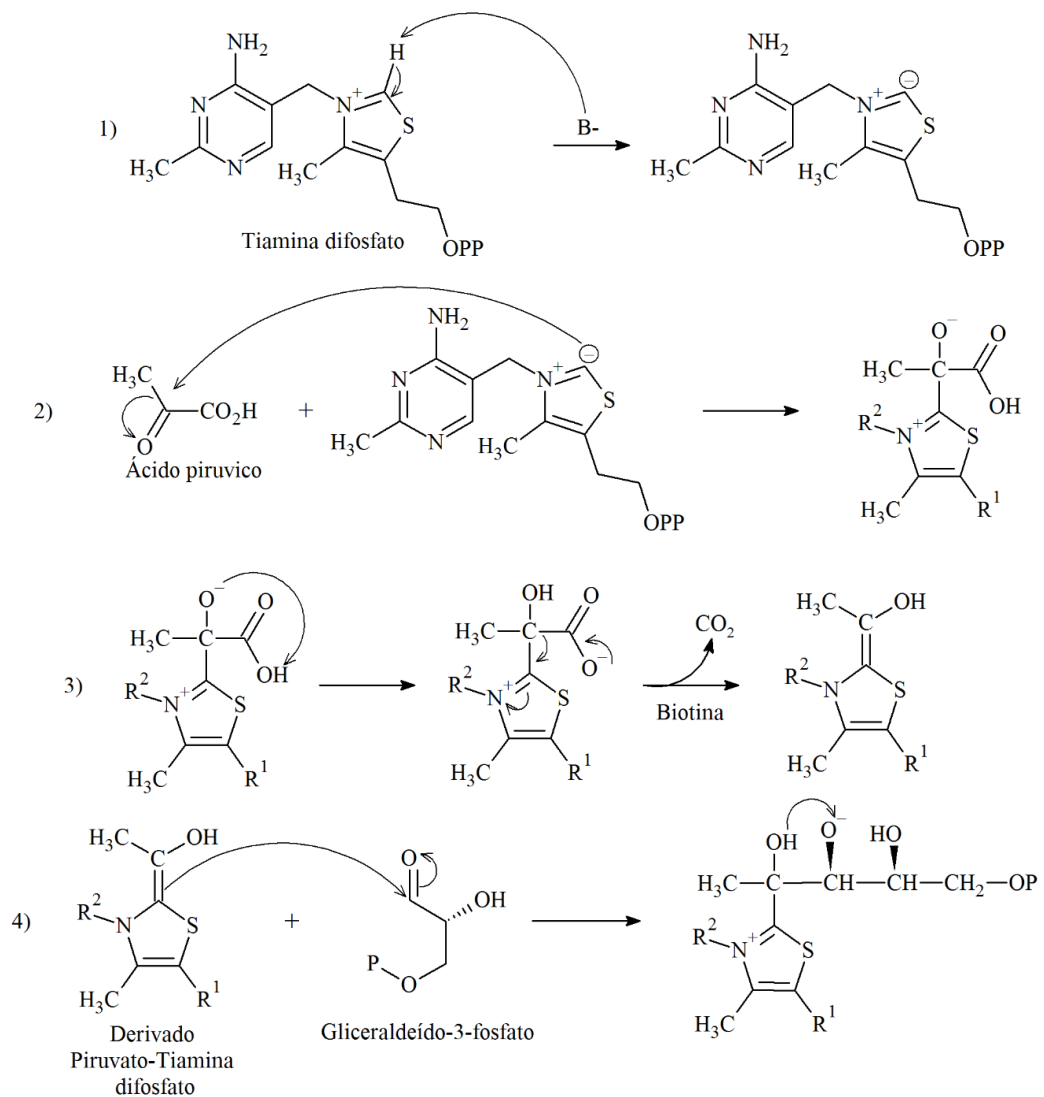
Fonte: Adaptado de Dewick (2009).

Outra rota biossintética para a formação de terpenos é a do 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato. Nessa via, os precursores IPP e DMAPP são formados pela descarboxilação do piruvato, mediada pela tiamina difosfato, produzindo um equivalente de acetaldeído ligado na forma de enamina, que atua como nucleófilo. A reação entre o derivado piruvato-tiamina-PP e o gliceraldeído-3-fosfato, seguida da eliminação da tiamina-PP, leva à formação do DXPS. O 2-C-metil-eritriol é gerado após o DXPS sofrer um rearranjo pinacol-pinacolona, com subsequente redução catalisada por NADPH. Em sequência, uma molécula de citidina trifosfato (CTP) se adiciona ao produto da etapa reacional anterior, formando o derivado de citidina 4-(CDP)-2-metil-D-eritrol-4P, que, então, é fosforilado por ação do ATP. O intermediário

resultante, após um rearranjo intramolecular e eliminação do grupo citidina monofosfato (CMP), é transformado em um composto fosfoanidro cíclico: o 2-C-metil-D-eritritol-2,4-ciclofosfato (FIGURA 8) (DEWICK, 2009).

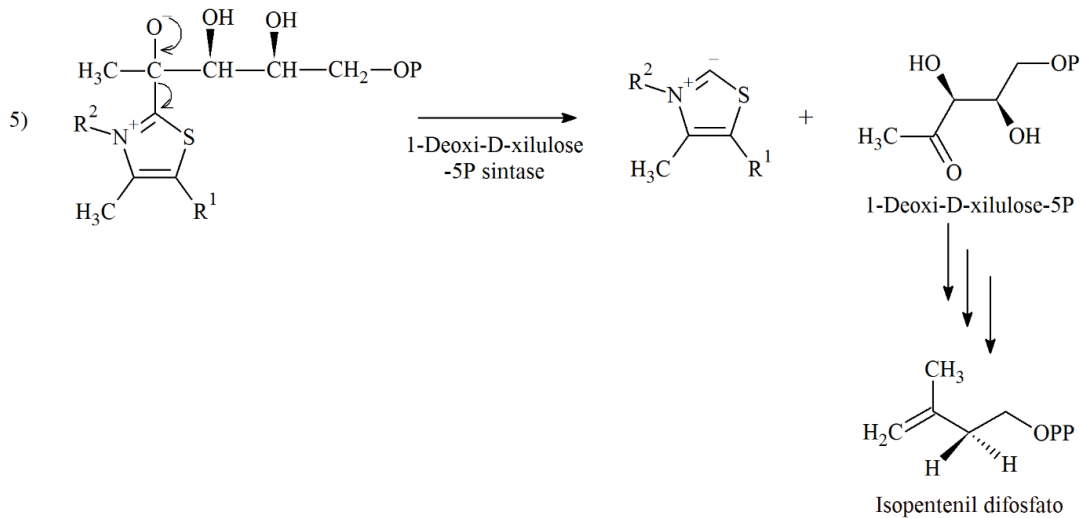
As etapas que conduzem à formação do IPP pela rota DXPS ainda não estão bem elucidadas. O IPP formado pode ser, então, convertido em DMAPP, sendo utilizado como substrato para as reações posteriores de formação de terpenos, conforme apresentado anteriormente (DEWICK, 2009).

Figura 8 – Biossíntese do IPP via DXPS. (Continua)



Continua...

Figura – 8 Biossíntese do IPP via DXPS. (Conclusão)



Conclusão.

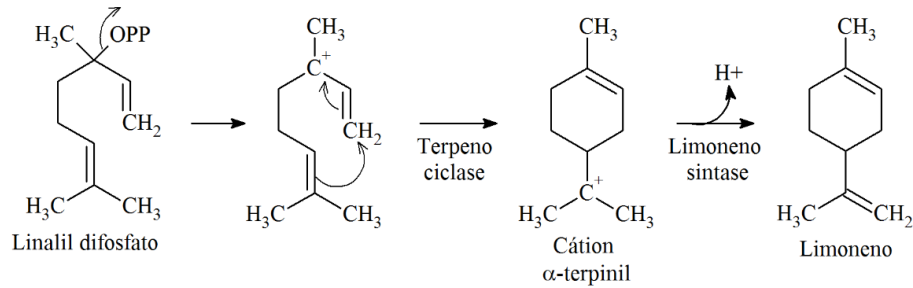
Fonte: Adaptado de Dewick (2009).

2.3.1.1 Biossíntese do limoneno

O limoneno é um monoterpene cíclico insaturado que pode ocorrer em duas formas ópticas (*d*-limoneno e *l*-limoneno) ou em uma mistura racêmica (*dl*-limoneno), sendo o *d*-limoneno a forma mais importante comercialmente devido ao seu aroma e sabor. Atualmente, o limoneno é obtido do fracionamento de óleos essenciais cítricos, como um subproduto das indústrias de sucos de laranja e citros. Considerado um produto GRAS (geralmente reconhecido como salvo, do inglês *Generally Recognized As Safe*) pela Food and Drug Administration dos Estados Unidos, suas aplicações incluem desde aromatizante em bebidas, doces, produtos de limpeza e perfumes, inseticidas, precursor para compostos aromáticos ou medicinais (como o ácido perílico, carvona e mentol), a unidade básica para produção de polímeros e combustível (CAO et al., 2016; JONGEDIJK et al., 2016).

Nas plantas, o limoneno pode ser sintetizado por reações enzimáticas a partir do intermediário linalil difosfato (FIGURA 9). Após a perda do grupo difosfato, o LPP origina um composto catiônico que sofre rearranjo catalisado por enzimas da classe terpeno ciclases, formando o cátion α -terpinil. A etapa seguinte consiste na desidrogenação do α -terpinil, facilitada pela limoneno sintase, originando o metabólito limoneno (DEWICK, 2009; TRINDADE et al., 2018).

Figura 9 – Biossíntese do limoneno a partir do intermediário linalil difosfato.



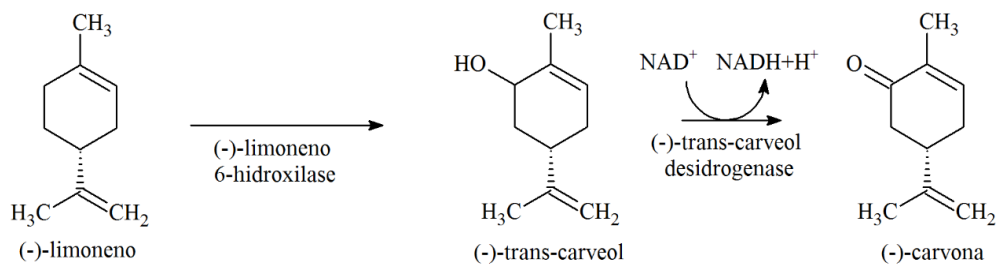
Fonte: Adaptado de Dewick (2009).

2.3.1.2 Biossíntese da carvona

A carvona é um monoterpeno oxigenado que possui um grupo funcional cetona. Ao longo dos séculos, a carvona tem sido empregada indiretamente como metabólito de sementes de cominho (*Carum carvi* L.), endro (*Anethum graveolen* L) e hortelã (*Mentha spicata* L.) e utilizada na produção de cosméticos, creme dental, goma de mascar e preparações farmacêuticas (CARVALHO; FONSECA, 2006).

A carvona pode ser sintetizada por modificações na molécula de limoneno (FIGURA 10). No metabolismo vegetal, o limoneno sofre uma reação de hidroxilação alílica, catalisada pela enzima estereoespecífica (-)-limoneno 6-hidroxilase, dependente de Citocromo P-450. O composto resultante ((-)-trans-carveol) é oxidado pela enzima (-)-trans-carveol desidrogenase, originando a (-)-carvona (BOUWMEESTER et al., 1998).

Figura 10 – Biossíntese da carvona a partir do limoneno.



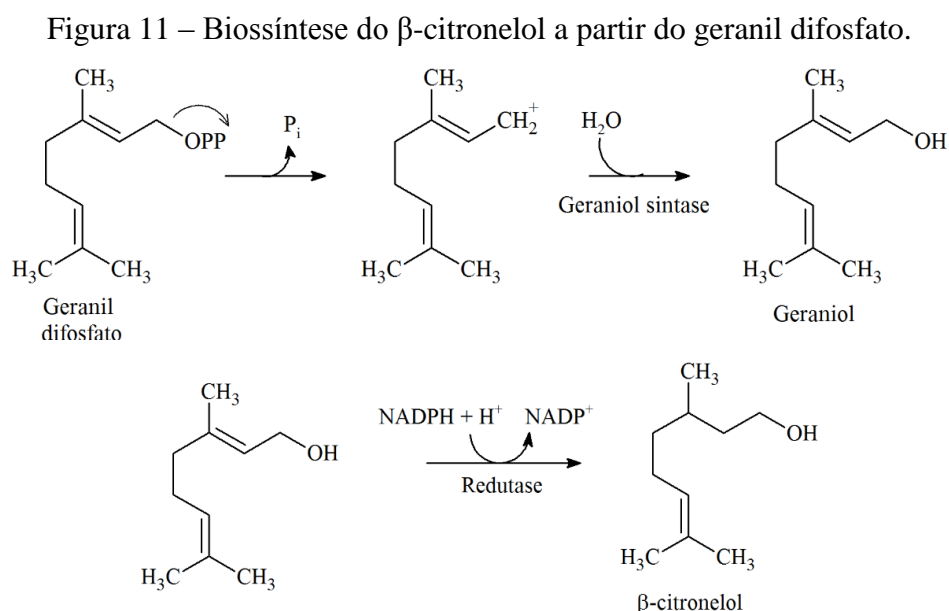
Fonte: Adaptado de Bouwmeester et al. (1998).

2.3.1.3 Biossíntese do β-citronelol

O citronelol é um monoterpeno que possui uma função álcool e ocorre naturalmente nas plantas em duas formas isoméricas: o R-(+)-citronelol (encontrado principalmente em óleos essenciais de plantas da família *Rutaceae*) e o S-(-)-citronelol (presente majoritariamente nos

óleos essenciais de gerânio e citronela), sendo o isômero R mais comum. O β -citronelol (isômero R) é um metabólito produzido em espécies como *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon winterianus* e *Lippia alba*. É empregado como agente flavorizante de comidas ou bebidas e em perfumes devido às suas propriedades aromáticas e odor doce, semelhante ao de rosas (ELSHARIF; BUETTNER, 2017).

O β -citronelol pode ser sintetizado a partir do intermediário geranil difosfato (FIGURA 11). Com a saída do grupo abandonador difosfato da molécula de GPP, ocorre uma reação de hidratação catalisada pela enzima geraniol sintase, resultando no álcool primário geraniol. A partir dele, por uma redução estereoespecífica, é formado o β -citronelol (DEWICK, 2009).



Fonte: Adaptado de Dewick (2009).

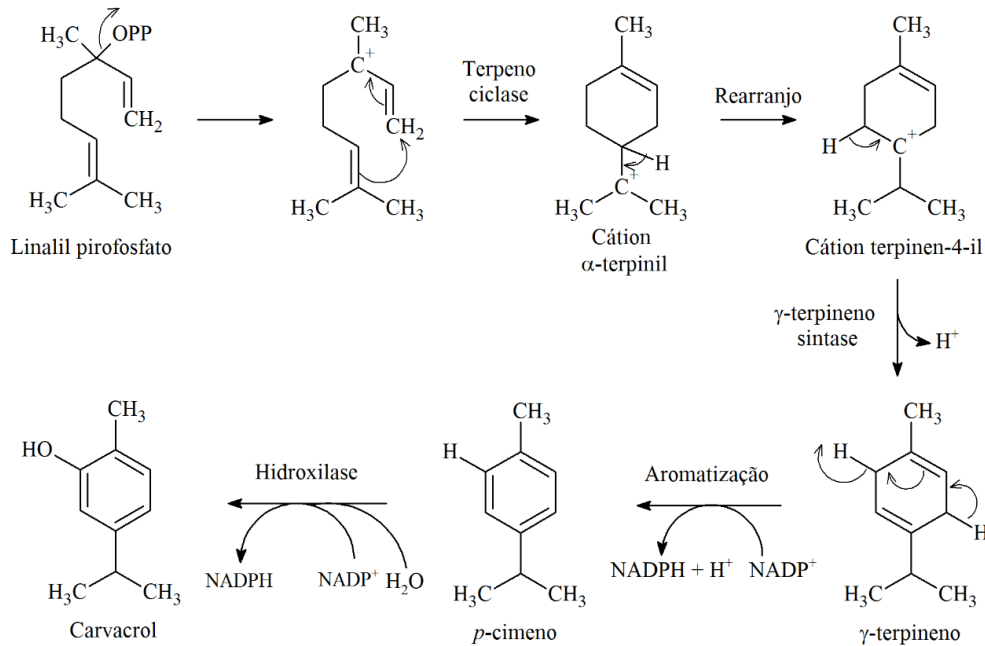
2.3.1.4 Biossíntese do carvacrol

O carvacrol é um monoterpeneo com características fenólicas que pode ser encontrado majoritariamente em óleos essenciais de várias espécies de plantas (*Origanum onites* L., *Origanum vulgare*, *Thymus capitata*, *Thymus maroccanus*, *Lippia sidoides*, *Thymbra spicata*, etc). É um composto considerado seguro (GRAS) pela Food and Drug Administration para uso em alimentos. Empregado comercialmente como saborizante, o carvacrol está incluído na lista de aromas químicos da Comissão Europeia (FRIEDMAN, 2014).

Uma provável rota biossintética para o carvacrol parte do intermediário linalil difosfato (FIGURA 12). Após a perda do grupo difosfato, o linalil sofre rearranjo em sua estrutura, originando o cátion α -terpinil. O deslocamento 1,2 do hidreto em α -terpinil ocorre por meio de

um rearranjo de Wagner-Meerwein e culmina na formação do cátion terpinen-4-il, que é convertido em γ -terpineno pela enzima γ -terpineno sintase, com a perda de um próton. Este, por sua vez, sofre uma reação de aromatização, formando o composto mais estável, *p*-cimeno, que, por ação de um hidroxilase, origina o carvacrol. (DEWICK, 2009; POULOUSE; CROTEAU, 1978).

Figura 12 – Biossíntese do carvacrol a partir do intermediário linalil difosfato.



Fonte: Adaptado de Dewick (2009) e Friedman (2014).

2.3.2 Biossíntese de fenilpropanoides

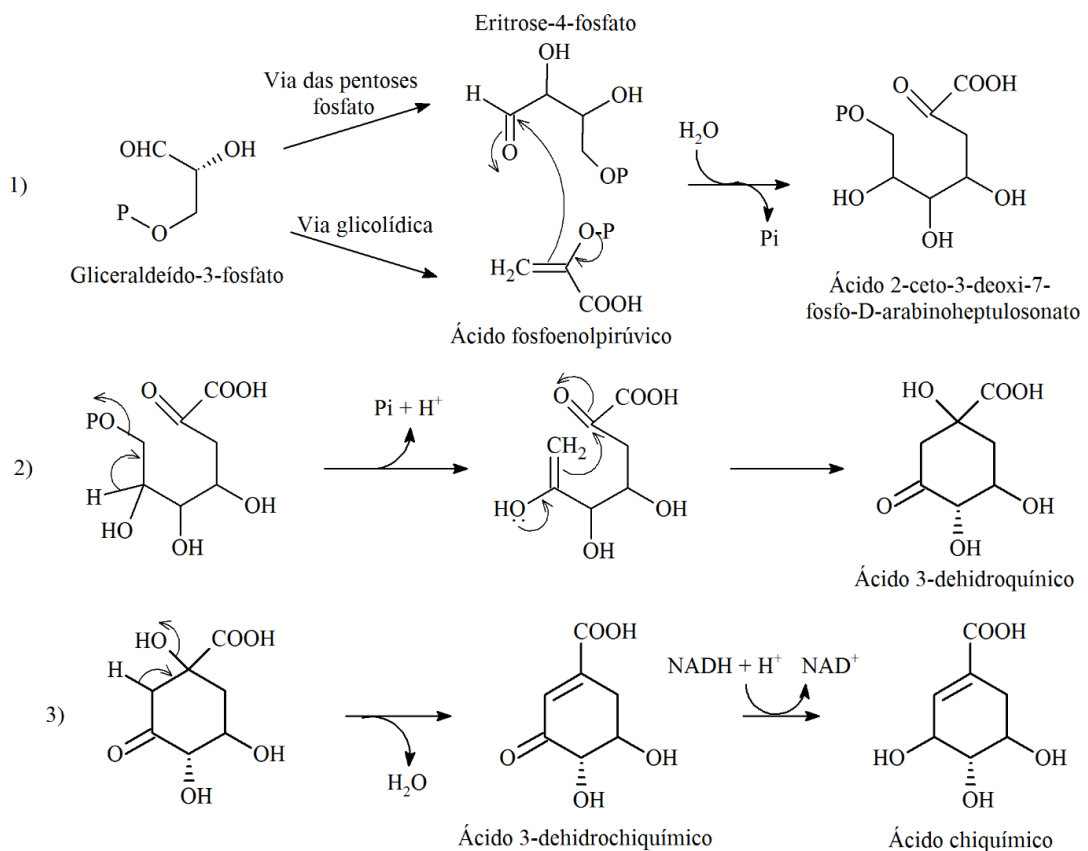
Os fenilpropanoides são compostos derivados da glicose, pela via do chiquimato ou ácido chiquímico. Sua estrutura básica é formada por um anel benzênico ou fenólico e uma cadeia carbônica lateral. Alguns fenilpropanoides podem conter oxigênio na cadeia lateral, pertencendo a classes como aldeído, cetona ou álcoois. O ácido chiquímico é formado após uma série de etapas de desidratação e redução, que se iniciam pela condensação aldólica do fosfoenolpiruvato e da eritrose-4-fosfato, ambos metabolitos da glicose. Uma vez sintetizado, o ácido chiquímico pode ser convertido em ácido corísmico, após a adição de outra molécula de fosfoenolpiruvato, catalizada pela enzima ácido 3-fosfato-3-enolpiruvilchiquímico sintase (EPSP) (DEWICK, 2009; SIMÕES et al., 2007).

Os aminoácidos fenilalanina e tirosina, precursores dos fenilpropanoides, originam-se do ácido prefênico (produto do rearranjo intramolecular do ácido corísmico, com o

deslocamento do grupo $-\text{OC}(\text{CH}_2)\text{COOH}$). Para formação da tirosina, as enzimas prefenato desidrogenase e NAD^+ catalisam a reação de descarboxilação do ácido prefênico, permitindo a eliminação de uma molécula de CO_2 . O composto resultante sofre uma aminação redutiva catalisada pela enzima amino transferase. A fenilalanina é biossintetizada pela desidratação e descarboxilação do ácido prefênico. Essa etapa é catalisada pela prefenato desidratase e ocorre liberação de uma molécula de água e CO_2 . O aminoácido fenilalanina é obtido pela aminação, de forma semelhante à tirosina. Após uma reação enzimática, a fenilalanina e a tirosina originam o ácido cinâmico e cumárico, respectivamente. O ácido cinâmico é o precursor da maioria dos fenilpropanoides (SIMÕES et al., 2007).

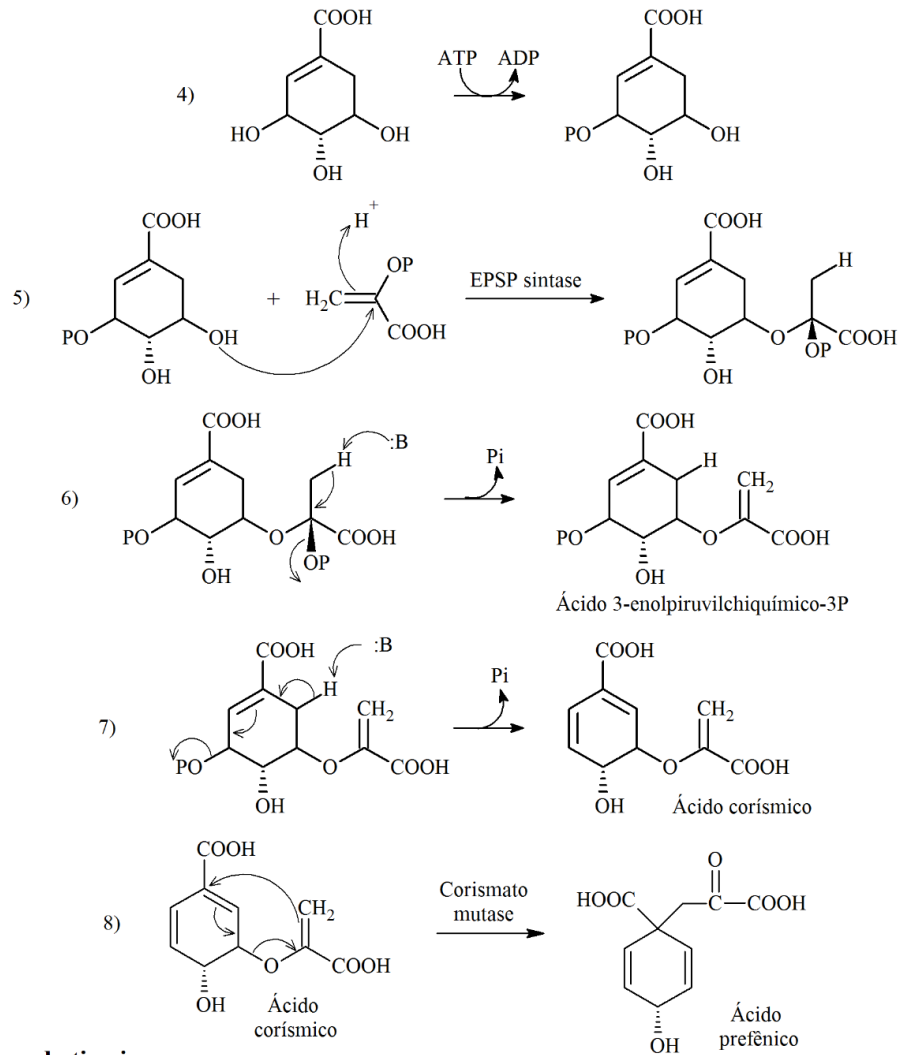
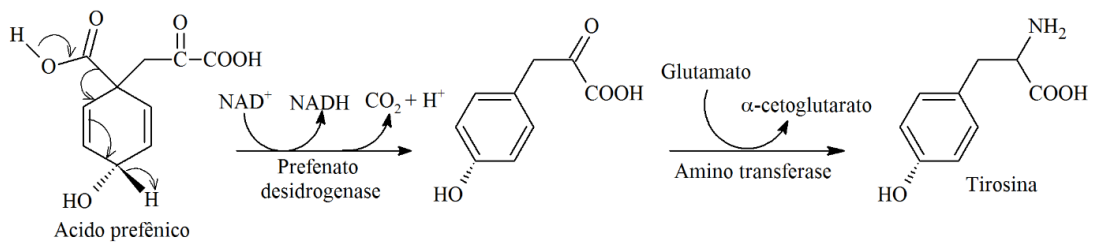
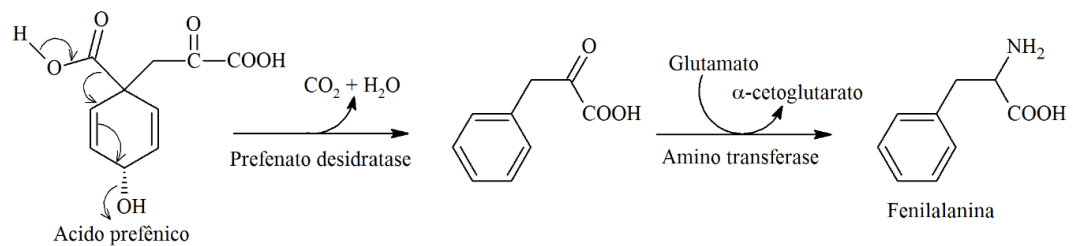
Reações nas cadeias laterais dos ácidos cinâmico e cumárico geram os fenilpropanoides. A redução enzimática produz propenil ou alilbenzenos, ao passo que a oxidação com degradação das cadeias laterais leva à formação de aldeídos aromáticos. Esses ácidos também podem sofrer ciclizações enzimáticas e produzir compostos cíclicos com características aromáticas (FIGURA 13) (SIMÕES et al., 2007).

Figura 13 – Biossíntese de fenilpropanoides. (Continua)



Continua...

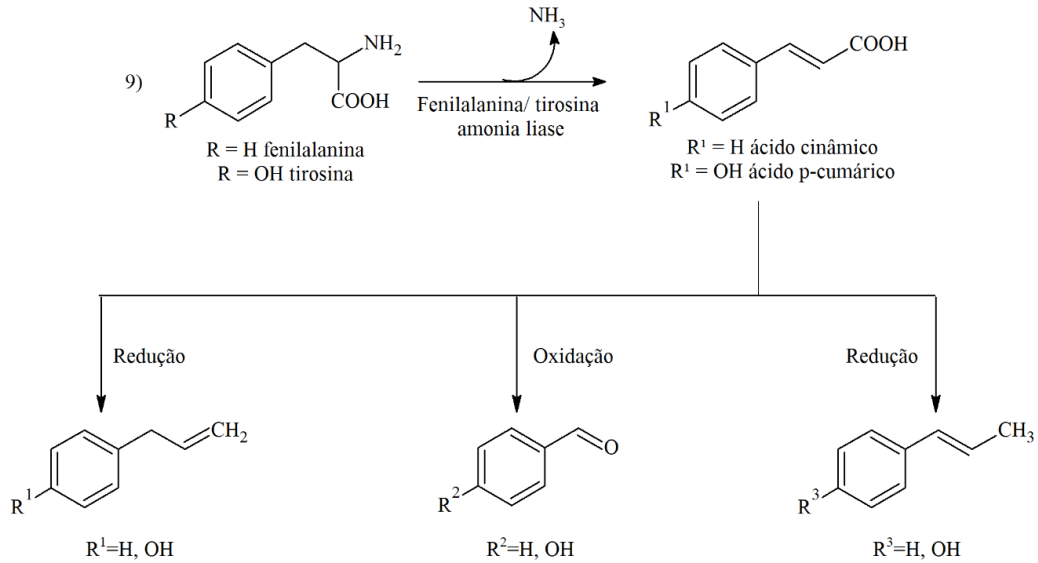
Figura 13 – Biossíntese de fenilpropanoides. (Continua)

**Biossíntese da tirosina****Biossíntese da fenilalanina**

Continua...

Figura 13 – Biossíntese de fenilpropanoides. (Conclusão)

Biossíntese do ácido cinâmico e *p*-cumárico



Conclusão.

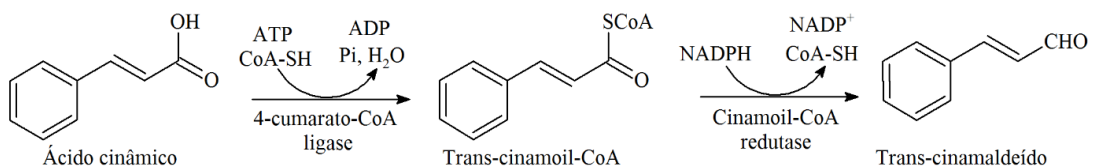
Fonte: Adaptado de Dewick (2009) e Simões et al. (2007).

2.3.2.1 Biossíntese do *trans*-cinamaldeído

O *trans*-cinamaldeído é um fenilpropanoide derivado da fenilalanina, encontrado em grande quantidade no óleo essencial de canela (*Cinnamomum* sp.). É amplamente empregado em alimentos e bebidas como flavorizante, em agroquímicos, antimicrobianos e agentes anticancerígenos, devido às suas propriedades biológicas (JO et al., 2015).

A biossíntese do *trans*-cinamaldeído pode ser descrita a partir do ácido cinâmico. Por ação da enzima 4-cumarato-CoA ligase, o ácido cinâmico é convertido em *trans*-cinnamoil-CoA, o qual sofre redução catalisada pela cinnamoil-CoA redutase, originando o composto *trans*-cinamaldeído (FIGURA 14) (BANG et al., 2016; LIN et al., 2019).

Figura 14 – Biossíntese do *trans*-cinamaldeído a partir do ácido cinâmico.



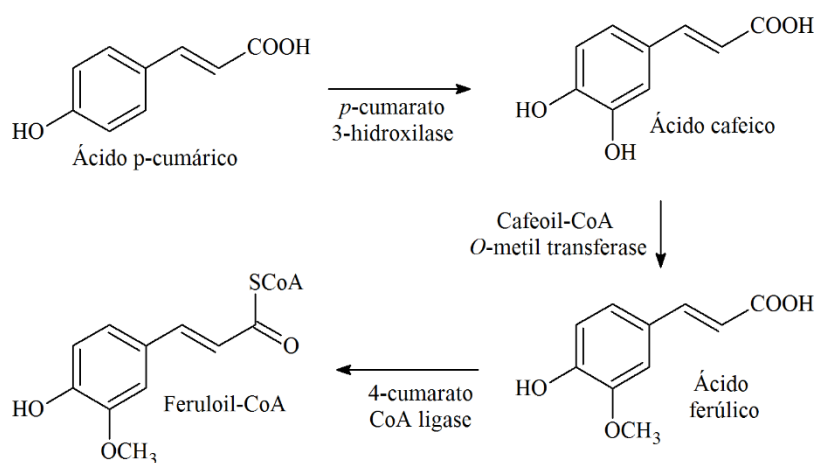
Fonte: Adaptado de Bang et al. (2016) e Lin et al. (2019).

2.3.2.2 Biossíntese do eugenol

O eugenol é um fenilpropanoide derivado da tirosina, comumente encontrado no óleo essencial de cravo (*Syzygium aromaticum* Mer & Per) e de alfavacão (*Ocimum gratissimum* L.). Dentre as aplicações comerciais do eugenol, podem-se citar o uso como matéria prima para obtenção do metil-eugenol e da vanilina (para flavorização de doces, chocolates, sorvetes e tabacos), unidade básica para síntese de produtos farmacêuticos, emprego como antisséptico em odontologia e na fabricação de dentifrícios (devido às suas propriedades anti-inflamatórias no alívio das dores de dente), também é explorado nas áreas de perfumaria, saboaria e como clarificador em histologia (COSTA, 2000).

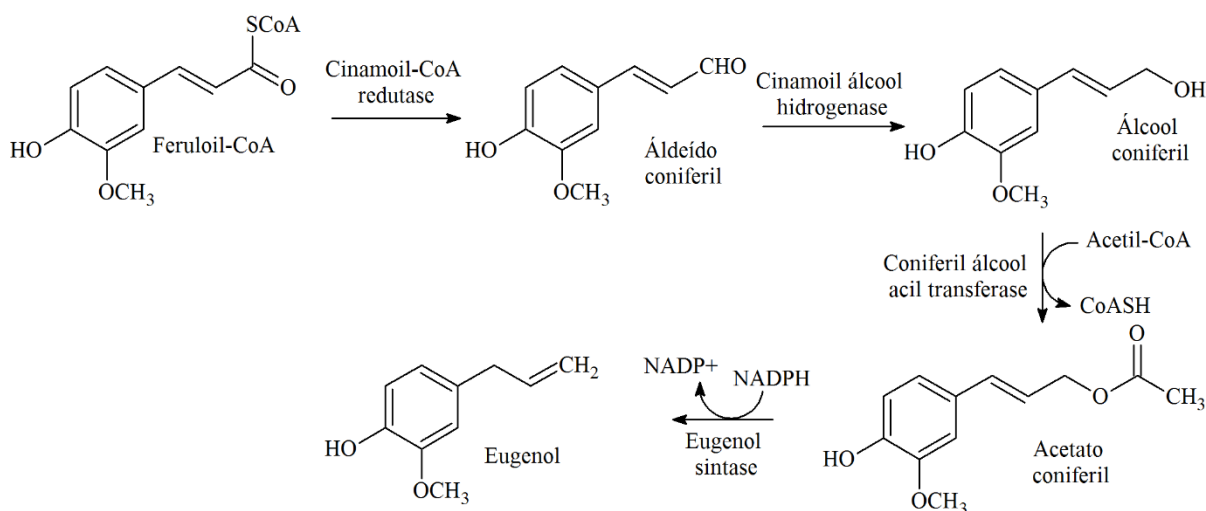
O mecanismo de biossíntese do eugenol não está bem elucidado. Uma possível rota é descrita por Khakdan et al. (2017). Nessa rota, a síntese do eugenol inicia-se a partir da produção de ácido cafeico pela hidroxilação do ácido *p*-cumárico, as reações que se seguem são catalisadas por enzimas específicas e estão representadas na Figura 15. Outra possível rota se inicia com a ligação de um grupo S-CoA ao ácido *p*-cumárico pela enzima 4-cumarato-CoA ligase, formando o *p*-cumaroil-CoA; este, por sua vez, é convertido em cafeoil-CoA pela enzima chiquimato *o*-hidroxil cinamoil transferase. O intermediário feruloil-CoA é obtido pela reação do cafeoil-CoA com a enzima cafeoil-CoA *o*-metil transferase, que, após uma série de etapas de redução, desidrogenção e adição de grupo acila, é convertido em eugenol em uma reação catalisada pela eugenol sintase.

Figura 15 – Biossíntese do eugenol a partir do ácido *p*-cumárico. (Continua)



Continua...

Figura 15 – Biossíntese do eugenol a partir do ácido *p*-cumárico. (Conclusão)



Conclusão.

Fonte: Adaptado de Khakdan et al. (2017) e Lu et al. (2017).

2.4 Potencialidades biológicas dos monoterpenos e fenilpropanoides

As características lipofílicas e hidrofílicas dos constituintes de óleos essenciais são importantes para sua bioatividade, uma vez que permitem a interação com membranas celulares, substratos enzimáticos, matrizes alimentícias, podendo impedir a proliferação de microrganismos ou deterioração e oxidação de produtos. A ampla gama de compostos presentes nos óleos essenciais com diferentes estruturas e funções conferem atividades que variam desde antioxidante, antimicrobiana, inseticida, antitumoral, anti-inflamatória, a efeitos alelopáticos, hemolíticos, hipocolesterolêmico, entre outros (BAKKALI et al., 2008; PERRICONE et al., 2015).

Alguns testes colorimétricos, como o sequestro de radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) e o sistema β -caroteno/ácido linoleico, são utilizados para avaliação do potencial antioxidante dos óleos essenciais. Para que um composto seja considerado um provável antioxidante, precisa apresentar em sua estrutura determinados grupos, como, por exemplo, hidroxilas fenólicas ou estruturas que permitem estabilização após a formação da espécie radicalar, como evidenciado no estudo de Silva et al. (2015). Os autores investigaram o potencial antioxidante do óleo essencial de *Satureja montana*, que apresentou como majoritários os constituintes timol (32,8%), **carvacrol** (14,3%) e *p*-cimeno (12,1%). Pelos resultados obtidos, infere-se que o óleo de *S. montana* foi capaz de estabilizar radicais DPPH e impedir a peroxidação lipídica no sistema β -caroteno/ácido linoleico.

Outro estudo que comprova o potencial biológico de óleos essenciais que possuem o constituinte carvacrol foi desenvolvido por Teixeira et al. (2014). Os autores avaliaram a influência que o óleo de *Lippia origanoides* (contendo 41,5% de **carvacrol** em sua composição) exerceu sob o pulgão *Myzus persicae* Sulzer, pelo ensaio de preferência com e sem escolha. Nesse teste, os pulgões são depositados no centro de uma placa de Petri contendo folhas tratadas com diferentes concentrações de óleo essencial (0%; 0,1% e 0,5%). Constatou-se que *M. persicae* apresentou maior preferência por seções foliares com menores concentrações. O óleo não apresentou efeito inseticida, no entanto, foi capaz de influenciar a reprodução dos pulgões, sendo a postura de ovos nas áreas foliares tratadas inferior àquela observada no controle com água.

Atualmente, pesquisas visando à aplicação dos óleos essenciais e seus constituintes têm se voltado para seu potencial antimicrobiano, em especial no controle de fungos e bactérias. Por possuírem uma constituição química complexa, os óleos essenciais apresentam mecanismos de atuação variados, interagindo com diversas estruturas celulares (BAKKALI et al., 2008; NAZZARO et al., 2013). Essas versatilidades lhes diferenciam e conferem vantagem sobre antibióticos sintéticos, geralmente seletivos quanto ao seu sítio de ação ou microrganismo-alvo (por exemplo, os antibióticos β -lactâmicos controlam infecções bacterianas, no entanto não afetam o desenvolvimento de fungos, ao passo que o óleo essencial de cravo-da-índia possui potencial antibacteriano, antifúngico, antioxidante, etc). Assim, o mesmo óleo pode inibir o desenvolvimento de inúmeros microrganismos, o que se torna útil principalmente no controle de patógenos deteriorantes dos alimentos, pois dispensa o emprego de mais de um conservante para combater microrganismos de diferentes origens.

Um dos mecanismos de ação fungicida propostos para os óleos essenciais se baseia na desestruturação da membrana plasmática pela inibição da síntese de ergosterol, importante componente da parede celular dos fungos. Ma et al. (2015) avaliaram os efeitos do óleo das sementes de *Anethum graveolens* L. (endro) e seus constituintes majoritários, **carvona** (41,5%) e **limoneno** (32,6%), no microrganismo *Sclerotinia sclerotiorum*, a fim de verificar os danos causados ao patógeno. O óleo essencial de endro foi capaz de inibir o crescimento fúngico, sendo seu potencial atribuído em 77% à carvona e 19% ao limoneno, além de diminuir significativamente o conteúdo de ergosterol presente na membrana plasmática de *S. sclerotiorum*, em uma relação dose-dependente.

Ainda em relação à atividade antimicrobiana dos óleos essenciais, podem-se citar os efeitos que seus constituintes exercem no controle de protozoários, como a espécie *Trypanosoma cruzi*, causadora da Doença de Chagas. Santoro et al. (2007) demonstraram que

99,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de óleo essencial de *Sygium aromaticum* (cravo-da-índia, **eugenol** (86,3%)) foi capaz de inibir 50% do crescimento de epimastigotas e causar alterações morfológicas nas estruturas dos protozoários (detectadas em microscópio eletrônico de varredura). Os autores observaram ainda que o desenvolvimento de tripomastigotas da corrente sanguínea foi reduzido pela metade com apenas 57,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de óleo, comprovando seu potencial biológico.

A ação anti-inflamatória dos óleos essenciais também é investigada devido à importância dos processos inflamatórios no surgimento de tumores, reações alérgicas ou cicatrização de feridas. De acordo com Kobayashi et al. (2016), o óleo de gerânio (rico em **citronelol** (39,6%)) exerceu efeito supressivo na degranulação de células de mastócitos induzida por imunoglobina Ig-E, sem afetar sua viabilidade. Han e Parker (2017), investigando as propriedades do óleo essencial de canela (**trans-cinamaldeído** (59,0%)), observaram inibição da produção de citocinas inflamatórias e atividade antiproliferativa sobre células fibroblásticas. Esses resultados indicam que o óleo de *C. zeylanicum* apresentou potencial anti-inflamatório, podendo promover a cicatrização de feridas.

Vários outros estudos evidenciam a ampla gama de atividades biológicas dos óleos essenciais. Rezende et al. (2017a) mostraram que esses metabólitos também podem atuar como antiofídicos. Os resultados obtidos pelos autores demonstraram que a atividade hemolítica do veneno de *Bothrops jararacussu* sofreu inibição de aproximadamente 45%, quando tratado com pequenas quantidades de óleo essencial de *Mentha piperita* (constituintes majoritários: **carvona** (84,34%) e **limoneno** (10,97%)). Complementarmente, Silva et al. (2017), avaliando o óleo essencial de *Mentha viridis* (linalol (40,70%) e **carvona** (13,52%)), observaram indução de fragmentação no DNA, inibição de hemólise induzida por peçonhas de *Bothrops moojeni* e *Lachesis muta* e inibição de fosfolipases de venenos de serpentes do gênero *Bothrops*.

2.4.1 Atividade antibacteriana dos monoterpenos e fenilpropanoides

Desde os primórdios da humanidade, o homem utiliza produtos naturais para o controle de patógenos. Como descrito anteriormente (item 2.4), os óleos essenciais são compostos importantes devido às suas propriedades biológicas, das quais ressalta-se o potencial antibacteriano (principalmente em virtude dos efeitos negativos gerados por muitos antibióticos sintéticos, como surgimento de cepas resistentes (QIAO et al., 2018)).

Diversas metodologias são empregadas para verificar a sensibilidade de bactérias a agentes antimicrobianos. Dentre os testes mais utilizados, estão os de diluição em caldo, difusão em cavidade ágar e difusão em disco. Essas técnicas são recomendadas pelo *National*

Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) como ensaios preliminares para avaliar a atividade antibacteriana de uma substância. Elas consistem basicamente em inocular o microrganismo em meios de cultura (líquido ou sólido), em contato com diferentes concentrações do antibiótico, a fim de definir uma concentração mínima inibitória (CMI) ou bactericida (CMB) (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, 2003a; 2003b).

Santiago et al. (2016) citam que o potencial antibacteriano de óleos essenciais determinado por métodos de difusão em ágar comumente resulta em atividade moderada, em relação aos testes de diluição em caldo. A baixa afinidade entre os constituintes dos óleos (lipofílicos) e o meio de cultura rico em água e ágar (relativamente polar) dificulta a absorção e espalhamento dos compostos presentes no óleo essencial pelo substrato. Todavia, os ensaios de difusão são válidos devido à volatilidade dos óleos essenciais, que contribuem para a formação de zonas de inibição e permitem determinar a CMI.

A técnica de diluição em caldo pode ser realizada de duas formas: empregando-se pequenos volumes de meio de cultura, geralmente 0,1 mL (microdiluição), ou volumes de caldo maiores que 1,0 mL (macrodiluição) (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, 2003a). Mahmoudzadeh et al. (2016) avaliaram a atividade inibitória do óleo essencial de *Carum copticum* (timol (36,4%), *p*-cimeno (31,4%) sobre *Escherichia coli*, por microdiluição em caldo de soja tríplica. Os autores empregaram concentrações de óleo que variaram de 0,01% a 0,2 %, e plaquearam os tratamentos em ágar de soja tríplica para determinar a dose bactericida. A CMI encontrada foi 0,05 % (equivalente a $0,5 \mu\text{L mL}^{-1}$) e a CMB identificada no plaqueamento foi 0,052% ($0,52 \mu\text{L mL}^{-1}$). Nos resultados obtidos nos testes de diluição, o óleo de *C. copticum* causou redução dose-dependente no crescimento bacteriano.

Zhang et al. (2017) utilizaram as técnicas de macrodiluição em caldo e difusão em disco em ágar para analisar os efeitos causados pelo óleo essencial de pimenta-preta (*Piper nigrum*) em *E. coli*. Quantitativamente, o óleo foi capaz de inibir o desenvolvimento do microrganismo em concentrações a partir de $1,0 \mu\text{L mL}^{-1}$, verificado no teste de diluição em caldo. O potencial antibacteriano foi classificado qualitativamente pelos halos de inibição observado nos ensaios de difusão. De acordo com Zhang et al (2017), o óleo essencial de *P. nigrum* apresentou forte atividade antibacteriana, demonstrada por halos que variaram de 17 mm a 26 mm, nas concentrações de 1,0 a $8,0 \mu\text{L mL}^{-1}$, respectivamente. Esse potencial foi atribuído à presença de monoterpenos, como α -pineno, β -pineno, limoneno e β -cariofileno, constituintes majoritários do óleo.

Empregando a metodologia de difusão em cavidade ágar, Rezende et al. (2017b) comprovaram o efeito bacteriostático de diferentes óleos essenciais (*Mentha piperita*; *Cymbopogon citratus*; *Rosmarinus officinalis*; *Peumus boldus* e *Foeniculum vulgare*) nos microrganismos *Salmonella Choleraesuis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogens*. De acordo com os pesquisadores, os óleos de *C. citratus* (geranial (47,7%), neral (35,4%)), *P. boldus* (formato de α -terpinil (61,9%), *p*-cimeno (15,45%)) e *M. piperita* (carvona (84,3%)) foram mais eficazes no controle dos patógenos. A espécie mais sensível à ação dos óleos essenciais foi *Salmonella Choleraesuis*, seguida por *E. coli*, ambas Gram-negativas. As bactérias *S. aureus* e *L. monocytogenes* (Gram-positivas) também foram inibidas pelas amostras, em concentrações que variaram de 15 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Esses resultados não corroboram com os descritos por Miranda et al. (2016), que estudando os mesmos microrganismos, avaliaram a atividade biológica de vários óleos essenciais. Os autores demonstram que as bactérias Gram-positivas foram mais sensíveis à ação dos óleos, apresentando CMI's que variaram de 3,9 a 500 $\mu\text{L mL}^{-1}$. A maior resistência dos microrganismos *E. coli* e *Salmonella Choleraesuis* foi explicada pela presença da membrana fosfolipídica externa, que dificulta a penetração de compostos hidrofóbicos devido à existência de grupos (como o grupo fosfato) ou moléculas polares (carboidratos ou proteínas). Ainda segundo os Miranda et al (2016), os óleos essenciais com maior conteúdo de monoterpenos apresentaram maior potencial inibitório, quando comparados aos óleos ricos em sesquiterpenos.

Esses estudiosos ratificam o fato de que cada óleo essencial atua por um mecanismo específico, de acordo com sua constituição química e com o microrganismo em estudo. Não obstante, para que um composto apresente bioatividade, independentemente do seu mecanismo de ação, ele deve ser capaz de interagir com o alvo. Nos casos em que se deseja controlar o desenvolvimento microbiano, é fundamental que a substância-teste possua afinidade pela membrana citoplasmática, uma vez que está é a “porta de entrada” para a célula. Devido às suas características lipofílicas e presença de grupos polares, diversos pesquisadores correlacionam a atividade dos óleos essenciais à sua hidrofobicidade e propensão à interação com os lipídios de membrana. Alterando a permeabilidade, integridade, capacidade osmorregulatória ou funções da estrutura, esses metabólitos podem causar extravasamento de íons ou conteúdos celulares, lise e morte celular (ANDRADE et al., 2015; MIRANDA et al., 2016; NAZZARO et al., 2013; NGUYEN et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2014; PATRA; BAEK, 2016; SANTIAGO et al., 2016; YANG; KHAN; KANG, 2015; ZHANG et al., 2017).

Várias técnicas vêm sendo desenvolvidas para investigar a atividade dos óleos essenciais e se baseiam em danos à estrutura da membrana citoplasmática; modificações no

DNA e na morfologia celular; alterações no pH e nas concentrações de ATP intra e extracelulares; interações com estruturas celulares, proteínas e enzimas; dentre outros alvos de ação. A liberação de conteúdos celulares por bactérias tratadas com antibióticos é um forte indicativo de danos à permeabilidade da membrana ou, até mesmo, rompimento da estrutura. (NAZZARO et al., 2013). Shen et al. (2015) demonstram que o *trans*-cinamaldeído (encontrado no óleo essencial de canela) causou extravasamento de materiais citoplasmáticos de *E. coli* e *S. aureus*. Esses dados corroboram com os resultados observados para condutividade elétrica das suspensões bacterianas tratadas com o constituinte. O aumento da condutividade nos grupos de tratamento em relação ao controle sugere o efluxo de íons celulares. Os pesquisadores comprovaram ainda os efeitos na permeabilidade das membranas bacterianas, aferindo a concentração de β -galactosidase citoplasmática na suspensão (enzima liberada quando a membrana celular é danificada) e constataram um aumento nos níveis enzimáticos nas cepas incubadas com *trans*-cinamaldeído. Por fim, micrografias obtidas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) e microscópio eletrônico de transmissão (MET) apontam os danos causados à estrutura externa e interna dos microrganismos.

Cui et al. (2015) investigaram o mecanismo de ação do óleo essencial de *Salvia sclarea* (acetato de linalil (74,5%)) em *S. aureus* e *E. coli*. O óleo foi capaz de reduzir a população bacteriana de ambas as espécies em mais de 99% com 1 hora de tratamento. Pelos estudos realizados, os autores demonstraram que o potencial bactericida da amostra pode ser relacionado aos efeitos nocivos causados sobre a parede celular dos microrganismos. Alterações na integridade da membrana bacteriana foram comprovadas pelo vazamento de constituintes celulares, redução nas concentrações de ATP intracelular e modificações morfológicas observadas em microscopia eletrônica de varredura. O tratamento das cepas com óleo essencial também causou uma redução nas concentrações de DNA em até 51% e 49% em *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente.

O óleo essencial de *Enteromorpha linza*, estudado por Patra e Baek (2016), foi capaz de causar perda da integridade da membrana celular de *Bacillus cereus*. Os autores demonstraram que o óleo prejudicou a permeabilidade da membrana, causando extravasamento de componentes essenciais à sobrevivência celular, constatado pela liberação de materiais absorventes em 260 nm e íons potássio, aumento da condutividade elétrica das suspensões tratadas e perda da capacidade de tolerância a sal. Imagens observadas em MEV mostram os efeitos danosos causados à morfologia bacteriana pelo óleo de *E. linza*, como superfície irregular e células inchadas.

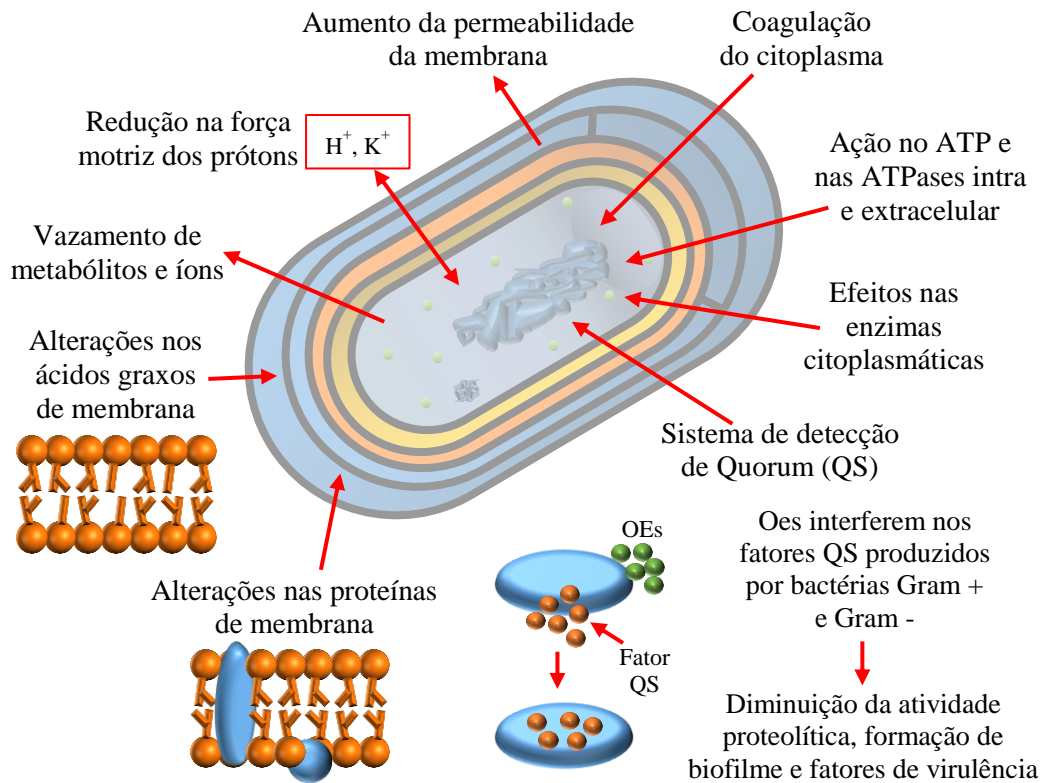
Além de avaliar a perda de conteúdo celulares e íons potássio, Paul et al. (2011) verificaram a concentração de ATP extracelular após o tratamento de cepas de *Bacillus subtilis* com óleo essencial de *Trachyspermum ammi* (constituintes majoritários: timol (49,6%), β -cimeno (16,3%), eugenol (3,04%)). Os pesquisadores relataram aumento significativo na liberação de ATP e atribuíram esse fato ao dano induzido pelo óleo essencial no envelope bacteriano, evidenciado na estrutura morfológica irregular e lise da membrana observada em micrografias obtidas por MEV.

Os constituintes dos óleos essenciais também podem transpor as membranas e alcançar o interior da célula, onde desencadearão interações danosas ao funcionamento normal do microrganismo. Xu et al. (2016) verificaram a ação direta do óleo essencial de cravo (eugenol) nas proteínas celulares e no DNA de *S. aureus*. Por eletroforese, os autores comprovaram que, no grupo de tratamento, houve diminuição no conteúdo de proteínas solúveis e desaparecimento de proteínas identificadas no controle não tratado, atribuído à influência do óleo na síntese, inativação ou agregação de proteínas. O óleo essencial também foi capaz de reduzir os níveis de DNA; no entanto, não apresentou afinidade para estabelecer ligações à molécula, implicando que seu mecanismo consiste na inibição da síntese desse ácido nucleico.

O mecanismo de ação do óleo essencial de *Chuzhou chrysanthemum* (β -eudesmeno (19,8%), *l*-borneol (16,5%), canfora (14,6%)) em *S. aureus* e *E. coli* foi descrito por Cui et al. (2018). Os autores observaram reduções nas atividades das enzimas adenosina trifosfatase e alcalina fosfatase induzidas pelo óleo nas duas bactérias. Adicionalmente, também foi verificada interrupção no metabolismo respiratório de *E. coli*, atribuído à inibição da enzima glicose-6-fosfato-desidrogenase. Em relação à *S. aureus*, foi constatada diminuição na atividade enzimática de fosfofrutoquinase, hexoquinase e piruvato quinase. Outro resultado obtido por Cui et al. (2018), que explica o mecanismo intracelular de ação do óleo, foi a inibição das enzimas topoisomerase I e II, moléculas-chave na síntese do DNA.

Uma vez que a atividade dos óleos essenciais pode estar relacionada a um constituinte químico, ao sinergismo entre os compostos ou à cascata de interações entre os constituintes dos óleos e diversos componentes da célula bacteriana (FIGURA 16), torna-se difícil determinar as rotas de inibição desses metabólitos. Assim, pesquisas visando elucidar a atuação dos constituintes isolados têm sido cada vez mais frequentes e são utilizadas como base para descrever o mecanismo de ação de óleos essenciais mais complexos. Esses estudos demonstram que mesmo os constituintes isolados podem induzir mais de uma resposta inibitória na célula (NAZZARO et al., 2013).

Figura 16 – Possíveis alvos celulares da ação antibacteriana de óleos essenciais.



Fonte: Adaptado de Nazzaro et al. (2013).

2.5 Contaminação alimentar

A alimentação é uma das necessidades básicas do ser humano. O crescimento populacional demanda a comercialização de grande quantidade de mantimentos todos os dias. A produção em larga escala, quando não acompanhada de um controle de qualidade rigoroso, pode levar à disseminação de agentes patogênicos e causar toxinfecções alimentares (MELO et al., 2018).

Os produtos alimentícios estão susceptíveis à contaminação ao longo de toda a cadeia produtiva, desde o preparo da matéria-prima, até o transporte e armazenamento. Substâncias que não se enquadram como um dos constituintes naturais do alimento são denominadas contaminantes e oferecem riscos à saúde do consumidor, podendo ser de caráter químico, físico ou biológico. Metais pesados, agrotóxicos, antibióticos, toxinas de animais ou plantas são exemplos de agentes químicos que podem corromper a qualidade do produto. Dentre os contaminantes físicos, citam-se fragmentos de vidro, metais ou insetos. A contaminação biológica, por sua vez, caracteriza-se pela presença de microrganismos ou animais tóxicos nos alimentos. No entanto, os microrganismos são os agentes contaminantes mais importantes no

que tange à saúde pública, devido à ampla variedade de espécies e patogenias que podem afetar o homem (FERREIRA; FREITAS; MOREIRA, 2014; MELO et al., 2018).

A presença de nutrientes básicos torna os alimentos substratos propícios ao desenvolvimento de patógenos, como bactérias, fungos filamentosos, parasitos ou vírus, sendo as bactérias citadas como principais causadoras de surtos por contaminação biológica. Essas contaminações podem gerar casos isolados e, dependendo do organismo, são facilmente combatidas. Todavia, um número considerável de pessoas é afetado anualmente, causando morbidade e mortalidade em todo o mundo (FLORES; MELO, 2015; MEDEIROS et al., 2015).

Alguns alimentos são frequentemente associados a doenças toxialimentares, tais como ovos e derivados, água, doces e sobremesas, leite e derivados, carnes de aves, suínos ou bovinos *in natura*, hortaliças e pescados. A assepsia e condições de higiene adequadas nem sempre são suficientes para evitar o desenvolvimento de alguns microrganismos. Devido ao surgimento de cepas resistentes, o uso de antibióticos é desaconselhável, além de representar um elemento de risco para a saúde do homem. Assim, buscam-se alternativas para o controle desses patógenos e os óleos essenciais se destacam por possuírem grande potencial biológico e amplo espectro de ação no combate a diferentes espécies infecciosas, tornando-se alvo de diversos estudos para aplicação direta em alimentos (CALO et al., 2015; MELO et al., 2018).

2.5.1 Doenças Transmitidas por Alimentos

Os alimentos contaminados podem causar as denominadas Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs). As DTAs são identificadas quando duas ou mais pessoas demonstram sintomas semelhantes após ingestão do mesmo produto contaminado, seja por microrganismos, seja por substâncias químicas ou objetos lesivos. Existem mais de 250 tipos de doenças transmitidas por alimentos. Elas estão associadas a perturbações gastrointestinais que variam conforme o patógeno, toxina, quantidade de alimento ingerido e saúde do organismo infectado. Crianças, idosos, gestantes e indivíduos imunocomprometidos são mais vulneráveis às DTAs e, em alguns casos, as complicações são graves, levando a óbito (OLIVEIRA, A. et al., 2010).

As doenças alimentares podem ocorrer por três formas distintas: toxinfecção (consumo de alimentos contaminados com microrganismos que produzem e/ou liberam toxinas após ingeridos); infecção (proliferação de patógenos no intestino, mucosa ou tecidos após ingestão destes); e intoxicação (ingestão de toxinas produzidas e/ou liberadas durante o desenvolvimento do microrganismo nos alimentos). Alguns dos sintomas mais comuns causados pelas DTAs são náuseas, vômitos, diarreia e, facultativamente, febre. Casos mais graves podem afetar as

meninges, rins, fígado, sistema nervoso central, terminações nervosas periféricas, etc (MELO et al., 2018).

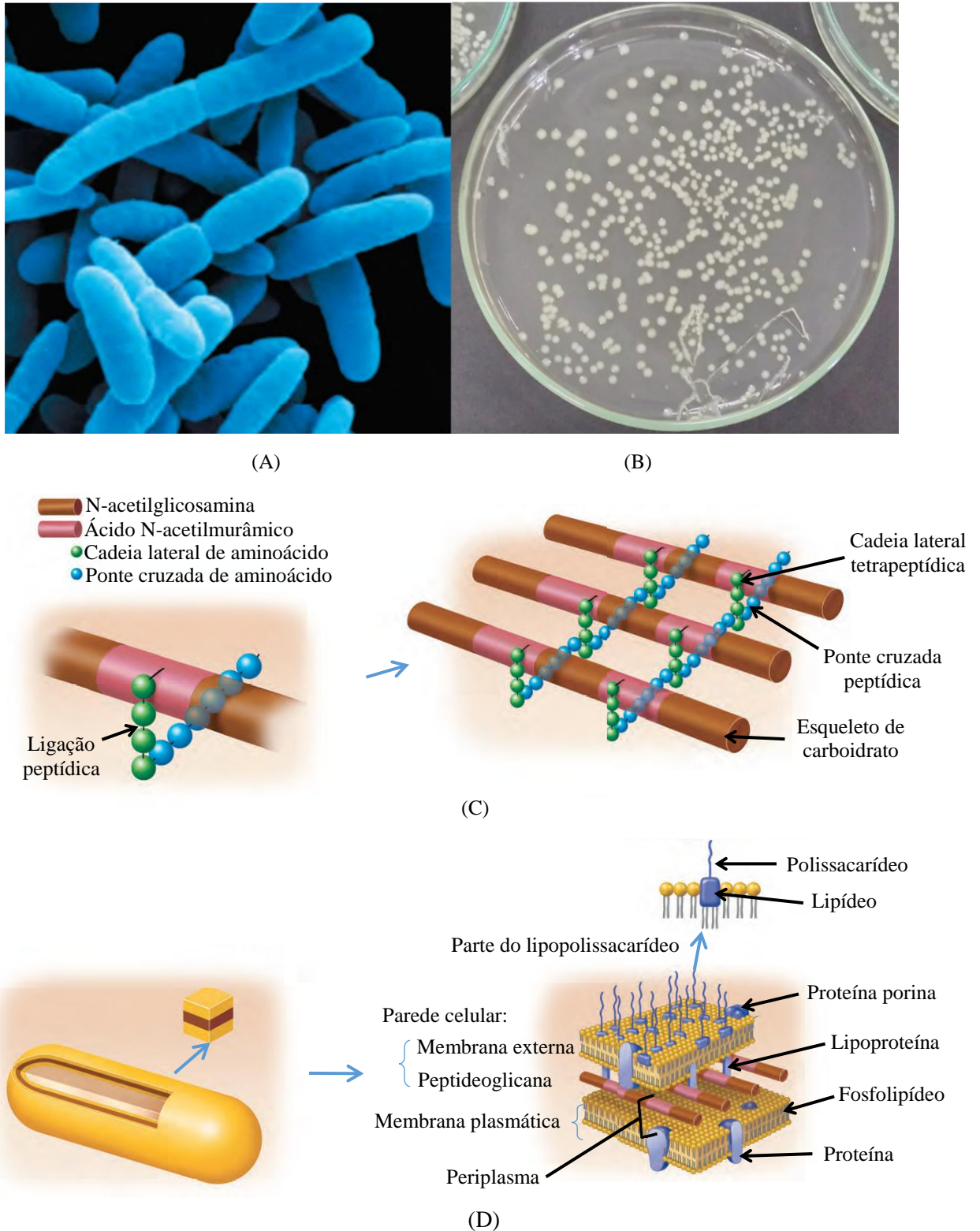
Somente no Brasil, entre os anos de 2000 e 2018, foram relatados cerca de 13.163 surtos relacionados a doenças transmitidas por alimentos, com 2.391.315 indivíduos expostos. Desses, aproximadamente 248.696 indivíduos adoeceram, causando 195 mortes. De 2009 a 2018, 23,4% dos surtos brasileiros identificados etiologicamente foram causados por *E. coli* e 9,4% estavam relacionados à intoxicação por *S. aureus*. De fato, *E. coli* pertence ao grupo de bactérias infecciosas e toxigênicas mais importantes, ao passo que *S. aureus* é classificada como uma das principais bactérias intoxicantes (BRASIL, 2018; 2019).

2.5.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli (FIGURA 17 A e B) são bacilos curtos, Gram-negativos, não esporulados, pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. Esses microrganismos possuem metabolismo anaeróbico facultativo e suas células podem ou não ser móveis, pois alguns apresentam flagelos peritríqueos. A faixa ótima de pH para seu desenvolvimento está entre 6 e 7, conseguindo tolerar bem as variações de pH de 4 a 9. As cepas de *E. coli* suportam ainda temperaturas de 7 a 46 °C, desenvolvendo-se extremamente bem entre 35 a 40 °C. São comumente encontradas no trato intestinal humano e sua presença na água ou nos alimentos indicam contaminação fecal e más condições de higiene (BATISTA, 2014; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

A estrutura da parede de uma célula Gram-negativa (FIGURA 17 D) consiste em uma membrana plasmática interna revestida por uma fina camada de peptidoglicana (FIGURA 17 C) e por uma membrana fosfolipídica externa. A camada de peptidoglicana é formada por cadeias de N-acetilglicosamina e ácido N-acetilmurâmico, unidas lateralmente por polipeptídeos. Já a membrana externa é composta de lipopolisacarídeos, lipoproteínas e fosfolipídeos. Sua permeabilidade a nutrientes se deve à presença de proteínas porinas, que formam canais e atravessam moléculas como aminoácidos, nucleotídeos, dissacarídeos, etc. Entre a membrana plasmática e a membrana externa da célula, está o periplasma, um fluido que contém enzimas de degradação e proteínas de transporte (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Figura 17 – Aspecto geral e estrutura da parede celular de *Escherichia coli*.



Legenda: A: Imagem obtida por MEV de células de *E. coli*. Fonte: Tortora, Funke, Case (2012). B: Colônias de *E. coli* em ágar Mueller-Hinton, Fonte: Do autor (2019). C: Estrutura da camada de peptidoglicana. Fonte: Tortora, Funke, Case (2012). D: Estrutura da parede celular de uma bactéria Gram-negativa. Fonte: Tortora, Funke, Case (2012).

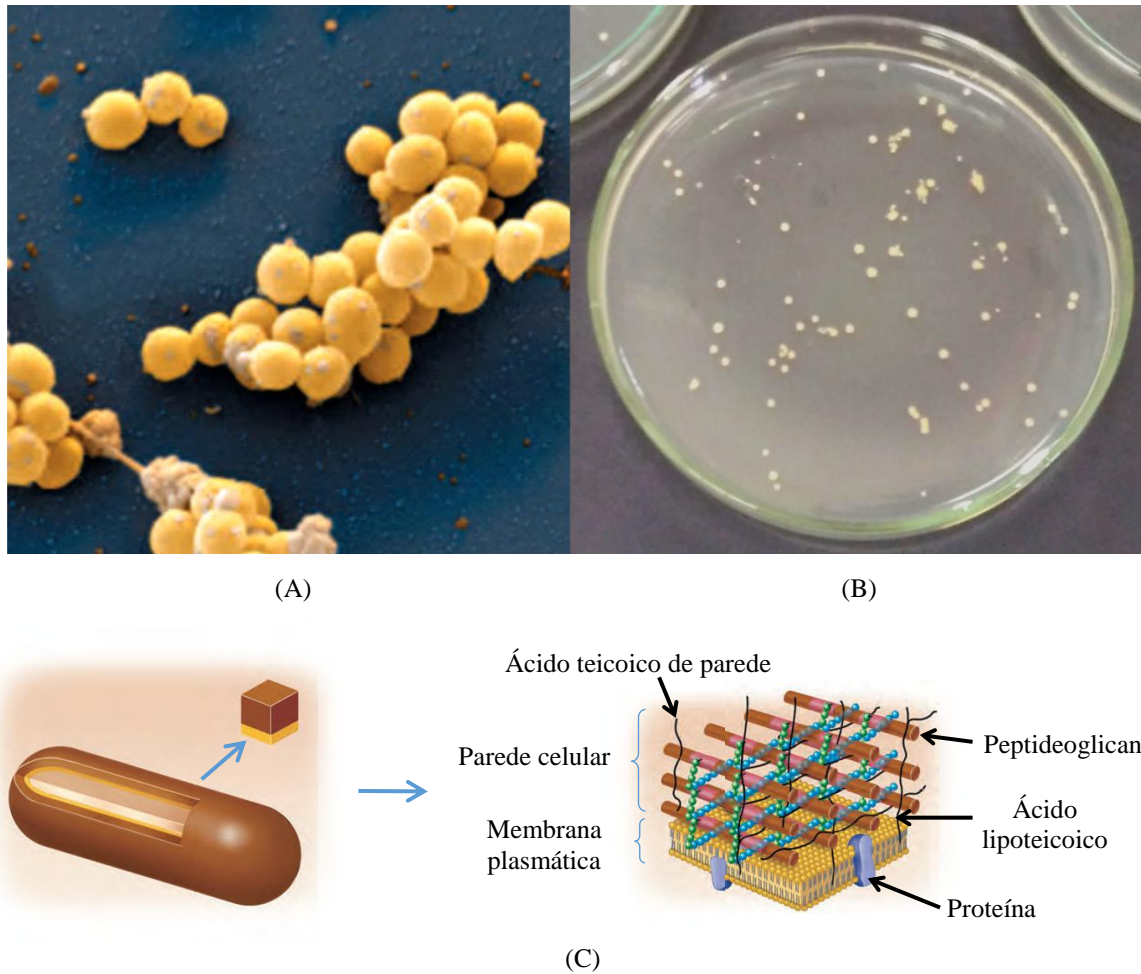
Dentre os alimentos envolvidos em DTAs causadas por *E. coli*, destacam-se as carnes, embutidos (como, por exemplo, salsicha), leite cru, queijo, alface, melão, rabanete e água. As cepas de *E. coli* causadoras de enfermidades são classificadas em quatro tipos principais de acordo com a infecção: enteropatogênica (EPEC), enterotoxigênica (ETEC), enteroinvasor (EIEC) e enterohemorrágica (EHEC). Os sintomas da doença variam conforme a classe patogênica, mas apresentam em comum o surgimento de diarreias, náuseas, vômito e dor abdominal. As bactérias enteropatogênicas se estabelecem nas microvilosidades do intestino e não produzem toxinas ou infecção invasiva. Contrariamente, as cepas enterotoxigênicas se fixam à mucosa intestinal e liberam toxinas, originando sintomas que persistem por 3 a 19 dias. Os microrganismos do tipo enterohemorrágicos causam diarreia acompanhada de hemorragia e podem produzir uma toxina denominada shiga-like ou verotoxina. A contaminação por *E. coli* enteroinvasiva também pode acarretar o surgimento de fezes com sangue; entretanto, as cepas EIEC se desenvolvem no cólon (BATISTA, 2014; MELO et al., 2018).

2.5.3 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus (FIGURA 18 A e B) são cocos Gram-positivos, não formadores de esporos, pertencentes à família *Micrococcaceae*, e ocorrem em agregados com estruturas semelhantes a cachos de uva. São microrganismos anaeróbios facultativos e mesófilos, desenvolvendo-se bem entre 7 e 47 °C em pH 7 a 7,5; porém, também apresentam crescimento em alimentos com pH entre 4,2 e 9,3 e em concentrações de sal de até 15 %. Naturalmente, são encontradas nas mucosas, cavidade nasal e na pele de grande parte dos animais de sangue quente (BATISTA, 2014; SANTANA et al., 2010).

As células Gram-positivas são formadas por uma membrana plasmática e uma parede que consiste basicamente de uma camada espessa de peptidoglicana (FIGURA 18 C). Na camada peptídica, há ainda a presença de ácidos teicoicos (fosfato ligado à um álcool, como glicerol ou ribitol), que regulam o movimento de cátions para o interior e exterior da célula. Esses microrganismos, diferentemente dos Gram-negativos, não possuem periplasma; no entanto, são menos susceptíveis a rompimento mecânico (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Figura 18 – Aspecto geral e estrutura da parede celular de *Staphylococcus aureus*.



Legenda: A: Imagem obtida por MEV de células de *S. aureus*. Fonte: Tortora, Funke, Case (2012). B: Colônias de *S. aureus* em ágar Mueller-Hinton. Fonte: Do autor (2019). C: Estrutura da parede celular de uma bactéria Gram-positiva. Fonte: Tortora, Funke, Case (2012).

Ao contaminar produtos alimentícios, *S. aureus* pode produzir e liberar toxinas termorresistentes, denominadas enterotoxinas. Apenas 1 μg de enterotoxina (quantidade detectada em alimentos com proliferação de aproximadamente 10^5 unidades formadoras de colônia, UFC) pode desencadear gastroenterite em adultos. As infecções ocasionadas por esses microrganismos geram náuseas, vômitos, diarreias, dores abdominais e, em alguns casos, salivação intensa, sudorese e desidratação. *S. aureus* são detectadas principalmente em carnes de bovinos, frangos e peixes, produtos lácteos (leite, queijos e coalhadas), molhos para saladas, cogumelos, enlatados, presunto, salame, produtos de panificação e cremes de ovos (BATISTA, 2014; MELO et al., 2018).

2.6 Antibióticos sintéticos e resistência bacteriana

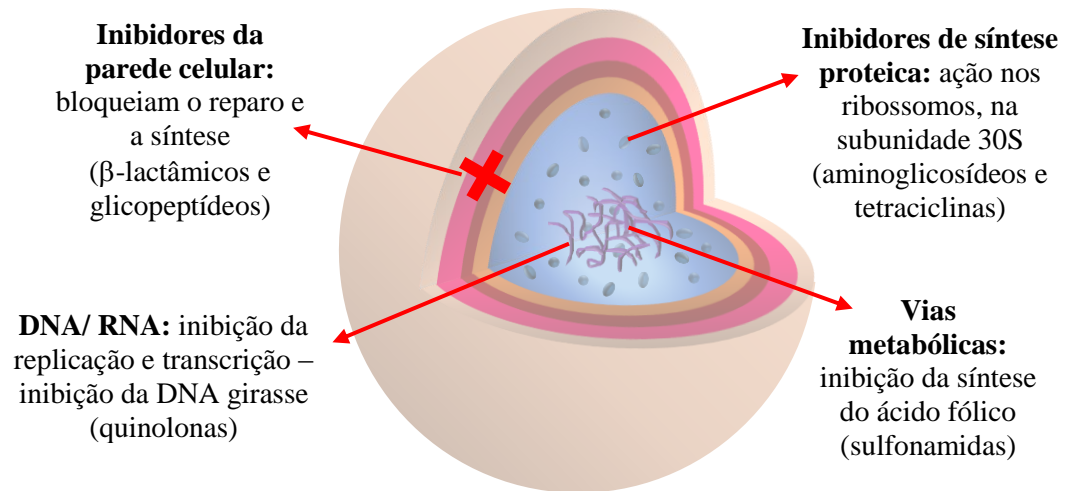
Tradicionalmente, microrganismos são combatidos com uso de antibióticos sintéticos. A maioria dos antibacterianos empregados atualmente são baseados em substâncias obtidas de fontes naturais. A penicilina, por exemplo, foi descoberta ao acaso e isolada de espécies de fungos do gênero *Penicillium*. Hoje, vários derivados mais ativos vêm sendo desenvolvidos e sintetizados e constituem uma classe de antibióticos denominada β -lactâmicos. A introdução da penicilina na terapia médica, em 1942, é um marco histórico na produção de quimioterápicos para controle de infecções. Contudo, essas drogas não são aplicáveis apenas ao tratamento humano, consistindo em um grande avanço também para a agricultura e pecuária (QIAO et al., 2018).

Embora se conheçam vários antibióticos atualmente, grande parte deles não são utilizados, principalmente devido à sua toxicidade. As drogas mais empregadas na terapia antibacteriana podem ser agrupadas em seis diferentes classes de acordo com seu mecanismo de ação: β -lactâmicos, aminoglicosídeos, glicopeptídeos, quinolonas, sulfonamidas e tetraciclina (SIMÕES et al., 2018).

Quando em contato com o microrganismo, os antibióticos podem causar alterações na estrutura bacteriana ou nas vias metabólicas de quatro formas: **impedindo a biossíntese da parede celular bacteriana** (inibição da síntese de peptidoglicano (glicopeptídeos) ou bloqueio das reações de ligação cruzada de unidades de peptidoglicano (β -lactâmicos)); **bloqueando vias metabólicas essenciais** (evitando a produção de DNA, RNA e proteínas pela descontinuação da via do folato (sulfonamidas)); **interferindo na síntese proteica** (obstruindo as subunidades ribossômicas 50S ou 30S. Para o tratamento de infecções, têm-se empregado apenas inibidores 30S (aminoglicosídeos e tetraciclina)); e **impossibilitando a síntese de ácidos nucleicos** (afetando os processos de replicação ou transcrição e a produção de mRNA (quinolonas)) (SIMÕES et al., 2018).

Na Figura 19, estão representados esquematicamente os diferentes alvos de agentes antibióticos na célula bacteriana.

Figura 19 – Representação dos diferentes alvos celulares da ação de antibióticos sintéticos.



Fonte: Adaptado de Simões et al. (2018).

Apesar dos avanços farmacológicos, a resistência microbiana é uma crise da saúde pública global; portanto, é preciso conscientizar a população sobre os riscos de utilizar medicamentos sem prescrição médica. O emprego incorreto de antibióticos e a interrupção do tratamento antes que a infecção seja completamente combatida elimina as bactérias sensíveis e seleciona as cepas resistentes. Isso permite a transferência de genes resistentes entre gerações, levando à proliferação e reemergência dessas cepas. Somaticamente, a grande capacidade de adaptação demonstrada por esses microrganismos diante de pressões seletivas colabora para a evolução e aumenta a vantagem de sobrevivência sobre determinado medicamento, dificultando significativamente a terapia (DIDELOT et al., 2016; QIAO et al., 2017; VENTOLA, 2015).

Além disso, com o passar dos anos, muitas bactérias desenvolveram mecanismos de resistência a diferentes antibióticos, resultando em microrganismos multirresistentes. Dentre eles, os mais problemáticos incluem *Pseudomonas aeruginosa*; *Acinetobacter baumannii*; *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* portadores de β -lactamases de espectro estendido; *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina e/ou vancomicina; *Mycobacterium tuberculosis* (extensivamente resistente a fármacos) e enterococos resistentes à vancomicina (ALEKSHUN; LEVY, 2007).

Por esses e outros fatores, a busca por novos antimicrobianos é um campo promissor e muito explorado. Todavia, para que um princípio ativo possa ser aplicado como medicamento, é preciso elucidar seu mecanismo de atuação.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Padrões utilizados

Os compostos empregados foram obtidos comercialmente. Foram testados carvacrol (99%, Sigma-Aldrich), carvona (99%, Acros Organics), β -citronelol (95%, Sigma-Aldrich), eugenol (99%, Vetec), limoneno (95%, Merck) e *trans*-cinamaldeído (99%, Acros Organics).

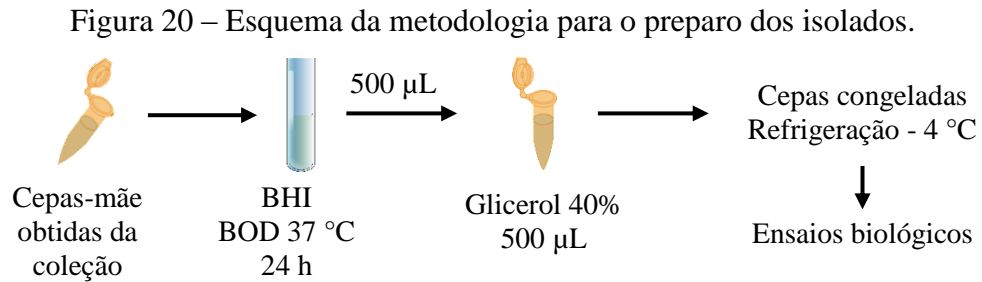
3.2 Ensaio biológico

Os ensaios para determinação do potencial antibacteriano dos padrões foram realizados no Laboratório de Micotoxinas e Micologia de Alimentos, do Departamento de Ciência dos Alimentos, da Universidade Federal de Lavras.

3.2.1 Microrganismos

Os microrganismos em estudo foram as bactérias *Escherichia coli* (cepa EPEP – 055) e *Staphylococcus aureus* (cepa ATCC – 13565), pertencentes à Coleção de Cultura de Microrganismos do Departamento de Ciência dos Alimentos, da Universidade Federal de Lavras. As cepas bacterianas (cepas-mãe) foram armazenadas em meio de congelamento contendo de glicerol (15%), peptona (5 g L⁻¹), extrato de levedura (3 g L⁻¹), NaCl (5 g L⁻¹), pH 7,2 \pm 7,4; em freezer sob refrigeração a -4 °C.

Na realização dos testes, os microrganismos foram mantidos por 10 meses em caldo infusão de cérebro e coração (BHI) e glicerol 20%; em freezer sob refrigeração a -4 °C. As cepas-mãe foram cultivadas em BHI, por 24 horas a 37 °C. Após o crescimento, 500 μ L desse inóculo foi transferido para microtubos (do tipo eppendorfs) contendo mesmo volume de uma solução estéril de glicerol 40%, sendo, posteriormente, congelado (RABINOVITCH; OLIVEIRA, 2015) (FIGURA 20).



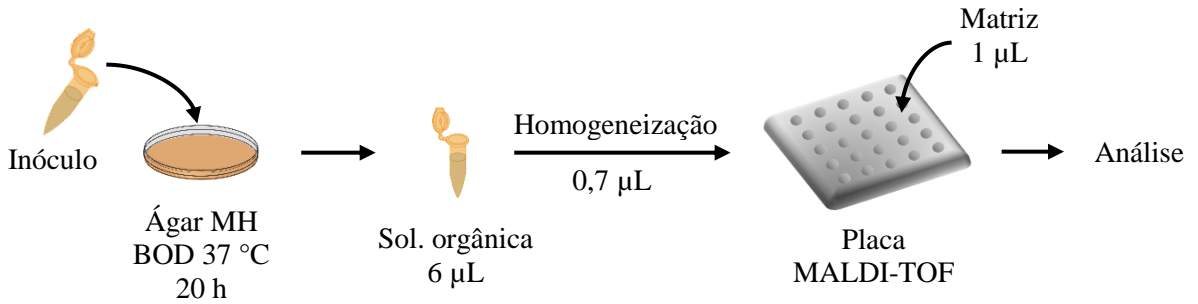
Fonte: Do autor (2019).

3.2.2 Determinação da pureza das cepas

A pureza das cepas foi avaliada empregando-se a técnica de análise dos perfis proteicos por MALDI-TOF MS, antes de iniciar os ensaios biológicos.

Os isolados foram estriados em placas de Petri contendo Ágar Mueller Hinton (MH), para verificar visualmente a existência de colônias diferentes. Uma alçada do inóculo foi transferida para as placas e incubada por um período de 20 horas a 37 °C. As bactérias crescidas foram transferidas para um microtubo eppendorf estéril, contendo 6 µL de solução orgânica (água/ acetonitrila/ ácido trifluoroacético, na proporção 50:47,5:2,5) e homogeneizadas em agitador do tipo vórtex (Vertex QL – 901) até a solubilização completa. Após, 0,7 µL dessa suspensão foi transferido para uma placa de aço inox do MALDI e deixado em repouso para secagem do excesso de líquido. Posteriormente, 1 µL da solução de matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA, Fluka; Buchs, Switzerland), saturada em solução orgânica, foi adicionado à placa do MALDI e misturado à suspensão. Essa mistura foi seca ao ar em temperatura ambiente e a análise foi realizada em um sistema MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) em triplicata, para avaliar a qualidade e reprodutibilidade dos espectros (FIGURA 21). Os espectros de massa foram obtidos em um espectrômetro de massas, equipado com um laser de 60,0 Hz, faixa de massa de 1960 a 20137 Da, taxa de amostragem de 0,50 GS/s, delay de 9589 pontos. Os parâmetros do aparelho foram: tensão da fonte de íons 1 (IS1) de 19,98 kV, tensão da fonte de íons 2 (IS2) de 18,28 kV, tensão de lentes de 6,00 kV, voltagem do detector linear de 2,6 kV, voltagem do detector refletor de 1,4 kV e tempo de extração de íons pulsados de 160 ns. Como padrão de calibração externa do MALDI-TOF MS, foi empregada *Escherichia coli* DH5 α , obtida da MUM (Micoteca do Minho). O microrganismo foi cultivado em meio Luria Bertani Ágar (triptona 10 g L⁻¹, extrato de levedura 5 g L⁻¹, NaCl 10 g L⁻¹) a 37 °C, por 20 horas (MIGUEL et al., 2017).

Figura 21 – Esquema simplificado da metodologia empregada para análise MALDI-TOF.



Fonte: Do autor (2019).

Os espectros de massa obtidos foram processados com o pacote de software 3.0 de MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). A identificação dos microrganismos foi realizada comparando-se as listas de picos geradas experimentalmente com as listas de picos dos espectros de referência da biblioteca do aparelho. Na avaliação dos resultados, foram considerados valores de *score* acima de 2,00 para identificação e determinação da pureza das cepas. Na Tabela 1, são descritas as médias dos *scores* obtidos.

Tabela 1 – Identificação dos microrganismos por MALDI-TOF.

Amostra	Espécie identificada	Score ¹	Pureza
ATCC 13565	<i>Staphylococcus aureus</i>	2,286 ± 0,036	Confirmada
EPEP 055	<i>Escherichia coli</i>	2,175 ± 0,023	Confirmada

Legenda: ¹Médias seguidas de desvio padrão. Fonte: Do autor (2019).

3.2.3 Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) dos padrões em *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

A concentração mínima inibitória (CMI) dos óleos essenciais foi determinada pela metodologia de macrodiluição em caldo, descrita pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, 2003a).

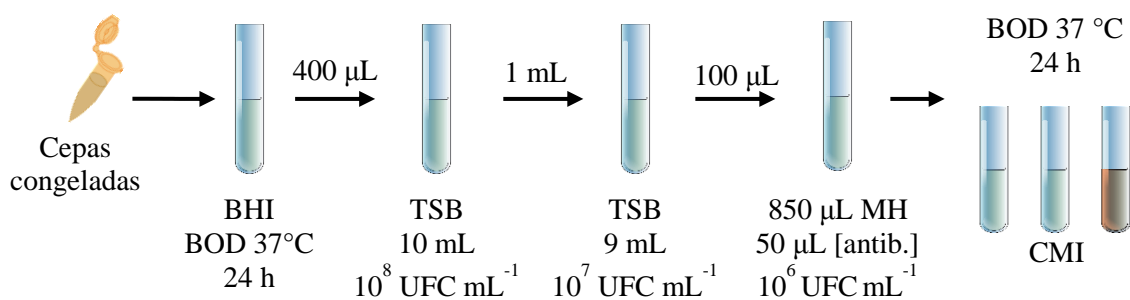
A CMI foi avaliada sobre cepas com concentração de 10^6 UFC mL⁻¹. Para isso, as bactérias foram repicadas em caldo BHI na temperatura de 37 °C, por 24 horas. Após esse período, uma alíquota do inóculo foi transferida para um tubo contendo 10 mL de caldo de soja tríplica (TSB). Ajustou-se a turbidez dessa solução em espectrofotômetro (Specord 200 Plus, Analytik Jena AG Germany) no comprimento de onda de 625 nm, para que a absorvância da

amostra correspondesse ao intervalo de 0,08 a 0,1 Å, equivalente à concentração de 10^8 UFC mL⁻¹. Para realização dos testes posteriores, 1 mL do inóculo padronizado foi diluído em 9 mL de caldo TSB, resultando na concentração de 10^7 UFC mL⁻¹.

Em tubos de ensaio estéreis, foram adicionados 850 µL de caldo Mueller-Hinton (MH), 100 µL de suspensão bacteriana (10^7 UFC mL⁻¹) e 50 µL de soluções de padrão diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO, 99,9%; Synth) nas proporções de 1:1; 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64; 1:128 e 1:256. A concentração final das amostras nos tratamentos foi calculada a partir da densidade de cada padrão e expressa em µg mL⁻¹. A concentração de inóculo resultante nos tubos foi de 10^6 UFC mL⁻¹. Homogeneizou-se essa solução em agitador tipo vórtex (Vertex QL – 901) e incubou-se por 24 horas a 37 °C em BOD. A CMI foi determinada como a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano, observado visualmente pelo turvamento das soluções (FIGURA 22).

O controle bacteriano foi preparado incorporando-se 100 µL de suspensão bacteriana a 900 µL de caldo Mueller-Hinton. Para fins de comparação (controle positivo), foi empregado o antibiótico sintético cloranfenicol (Succinato sódico de cloranfenicol, Novafarma) em concentrações que variaram de 0,09 a 1000 µg mL⁻¹. A influência do DMSO (controle negativo) no crescimento bacteriano foi analisada adicionando-se 50 µL de DMSO aos tubos contendo 850 µL de caldo MH e 100 µL de inóculo 10^7 UFC mL⁻¹. Todos os testes foram realizados em triplicata.

Figura 22 – Esquema simplificado do teste de macrodiluição em caldo.

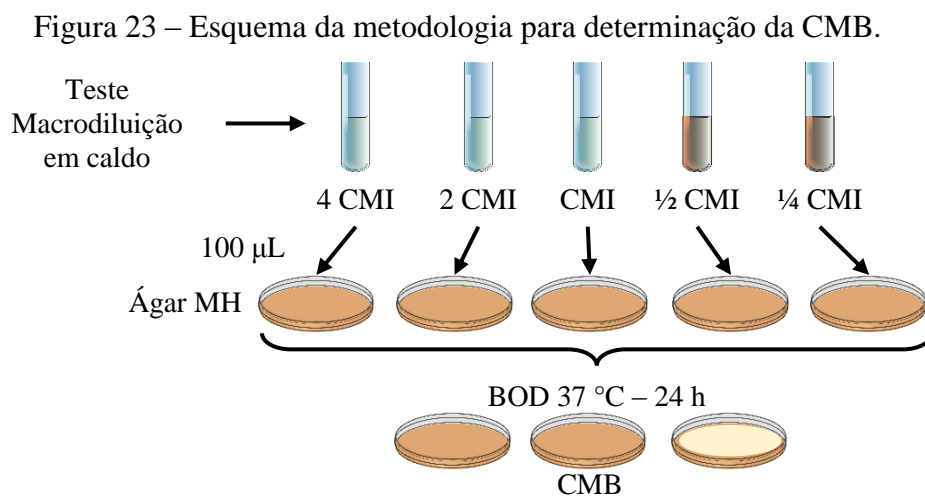


Fonte: Do autor (2019).

3.2.4 Determinação da concentração mínima bactericida (CMB) dos padrões em *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

Para confirmar a CMI e determinar a concentração mínima bactericida (CMB), foram plaqueados os tratamentos nas concentrações equivalente a ¼ CMI; ½ CMI; CMI; 2 CMI e

4 CMI. Os tratamentos foram preparados conforme descrito anteriormente para os ensaios de macrodiluição e, após 24 horas de incubação, uma alíquota de 100 μL das soluções foi espalhada em placas de Petri contendo 20 mL de ágar Mueller-Hinton. As placas foram embaladas e incubadas em BOD a 37 °C por 24 horas (FIGURA 23). Transcorrido esse período, avaliou-se o desenvolvimento bacteriano e a menor concentração que apresentou ausência completa de colônias foi definida como a CMB. Todos os tratamentos foram plaqueados em triplicata (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, 1999).



Fonte: Do autor (2019).

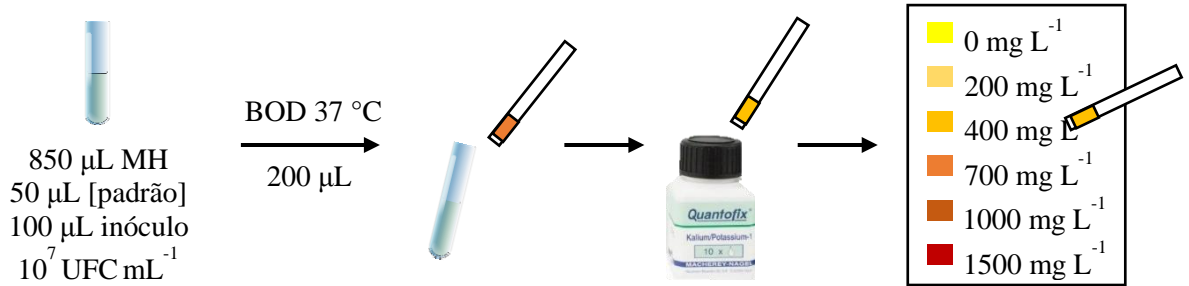
3.2.5 Avaliação da liberação de íons potássio por *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

Os ensaios para verificar a influência dos padrões na liberação de íons potássio pelas cepas de *E. coli* e *S. aureus* foram realizados empregando-se a metodologia descrita por Paul et al. (2011), com algumas modificações.

Inicialmente, adicionaram-se a tubos de ensaio estéreis 850 μL de caldo Mueller-Hinton, 100 μL de inóculo 10^7 UFC mL^{-1} e 50 μL das soluções dos padrões diluídos em DMSO nas CMBs obtidas. As suspensões resultantes foram homogeneizadas e alíquotas de 200 μL foram coletadas a cada 2 horas, para realização das medições dos níveis de potássio. A concentração de íons potássio livre em solução foi analisada utilizando-se o kit semiquantitativo Quantofix (Mecherey-Nagel, GmbH & Co., Germany), de acordo com as instruções descritas pelo fabricante (FIGURA 24). Simultaneamente, foi conduzido um experimento para determinar a liberação dos mesmos íons pelos microrganismos em condições naturais. Para isso, 100 μL de inóculo bacteriano 10^7 UFC mL^{-1} foram suspensos em 900 μL de caldo MH.

Avaliou-se também a concentração de potássio existente no meio de cultura puro. Os resultados foram expressos em termos de concentração de K^+ , em $mg\ mL^{-1}$ de solução, nos tempos de incubação de 0, 2, 4, 6 e 24 horas. As análises foram realizadas em triplicata.

Figura 24 – Esquema da metodologia empregada para avaliação de efluxo de potássio.



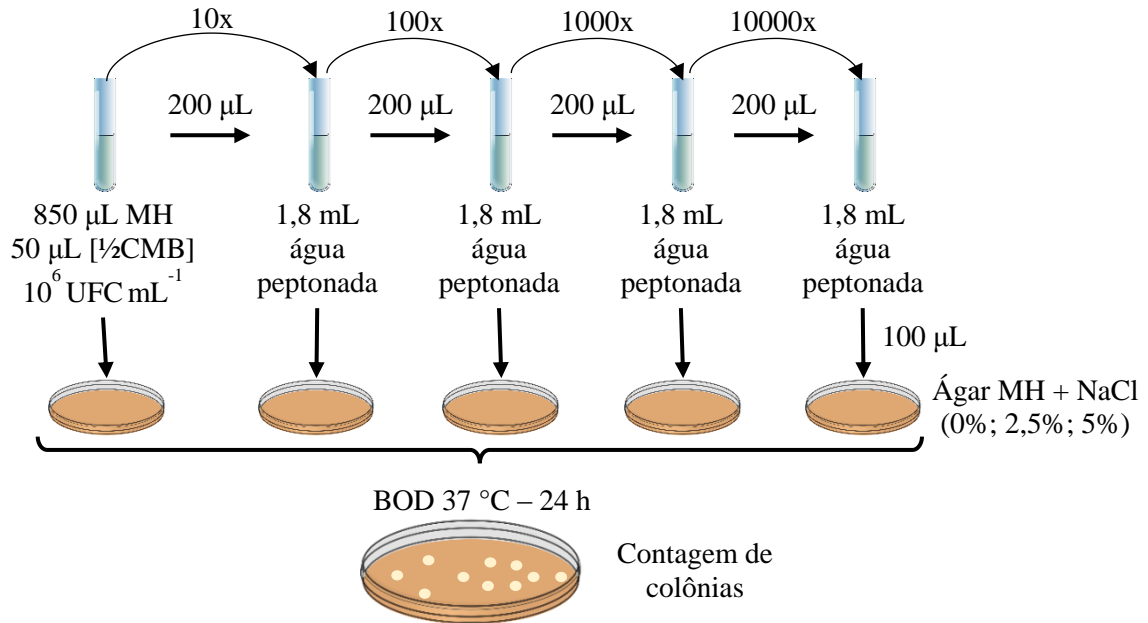
Fonte: Do autor (2019).

3.2.6 Avaliação da capacidade de tolerância a sal de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

Baseando-se na técnica descrita por Miksusanti et al (2008), com algumas alterações, estudou-se a influência dos padrões na capacidade de tolerância a sal de *E. coli* e *S. aureus*.

Foram pipetados 50 µL de soluções de padrão/ DMSO (em concentrações equivalentes a $\frac{1}{2}$ CMI) em tubos de ensaio contendo 850 µL de caldo MH e 100 µL de inóculo 10^7 UFC mL^{-1} . As suspensões obtidas foram diluídas em água peptonada (1%), nas proporções de 10, 100, 1000 e 10000 vezes. Uma alíquota de 100 µL de cada diluição foi plaqueada em meio ágar Mueller-Hinton, suplementado com 0; 2,5 e 5% de NaCl. As placas foram embaladas e incubadas em BOD a 37 °C por 24 horas (FIGURA 25). A fins de comparação, a capacidade de tolerância a sal das cepas de *E. coli* e *S. aureus* sem tratamento com os padrões foi avaliada. Adicionaram-se 100 µL das suspensões bacterianas na concentração de 10^7 UFC mL^{-1} a 900 µL de caldo Mueller-Hinton, diluíram-se e plaquearam-se as soluções em ágar MH suplementado. Após o período de incubação, o número de unidades formadoras de colônia foi determinado (UFC mL^{-1}) e os resultados foram convertidos em $\log(\text{UFC mL}^{-1})$. Todos os tratamentos foram preparados em triplicata e plaqueados em duplicata.

Figura 25 – Esquema da metodologia para avaliação da capacidade de tolerância a sal.

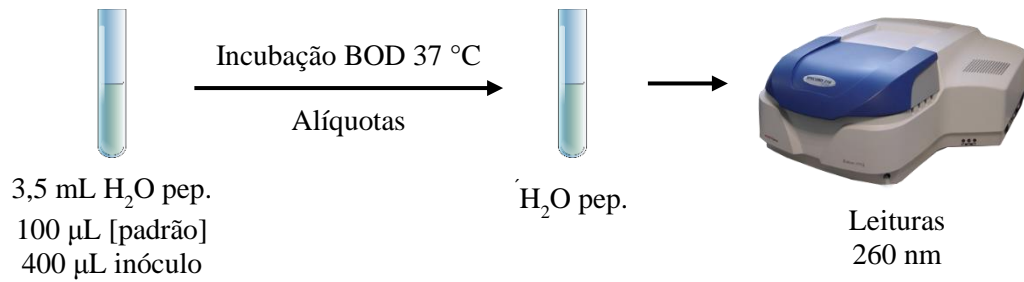


Fonte: Do autor (2019).

3.2.7 Avaliação da liberação de constituintes celulares por *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

Para avaliar a liberação de constituintes celulares absorventes em 260 nm, foi empregada a metodologia descrita por Yang, Khan, Kang (2015), com algumas alterações. Em tubos de ensaio, adicionaram-se 3,5 mL de água peptonada (0,1%), 400 µL de inóculo 10^8 UFC mL⁻¹ e 100 µL de diluição de padrão em DMSO, nas concentrações equivalentes a CMI e ½ CMI. A liberação espontânea de conteúdos celulares por *E. coli* e *S. aureus* foi analisada utilizando 3,6 mL de água peptonada (0,1%) e 400 µL de suspensão bacteriana 10^8 UFC mL⁻¹. Homogeneizaram-se e incubaram-se as soluções em BOD a 37 °C. Nos intervalos de tempo de 0, 1, 2, 3, 4 e 5 horas, alíquotas do tratamento foram coletadas e diluídas em água peptonada (0,1%), para realização das leituras de absorbância, empregando-se um espectrofotômetro Specord 200 Plus (Analytik Jena AG Germany), na faixa de 260 nm (FIGURA 26). As análises foram conduzidas em quatro repetições.

Figura 26 – Esquema da metodologia para avaliar a liberação de conteúdos celulares.



Fonte: Do autor (2019).

Uma vez que os constituintes dos óleos essenciais também absorvem energia na faixa de 260 nm, as amostras foram diluídas em água peptonada 0,1%. Os fatores de diluição para cada amostra foram determinados experimentalmente, de modo que a absorbância inicial da solução (no tempo zero) estivesse inserida no intervalo de 0,6 a 0,8 Å. Posteriormente, os resultados foram multiplicados pelos respectivos fatores de diluição e tratados estatisticamente, conforme explicado no item 3.3. Na Tabela 2, estão descritos os fatores de diluição obtidos para cada amostra.

Tabela 2 – Fatores de diluição para os tratamentos.

Amostra	Fator de diluição
Controle positivo	3x
Eugenol	11x
<i>Trans</i> -cinamaldeído	41x
Carvacrol	6x
Carvona	41x
B-citronelol	4x

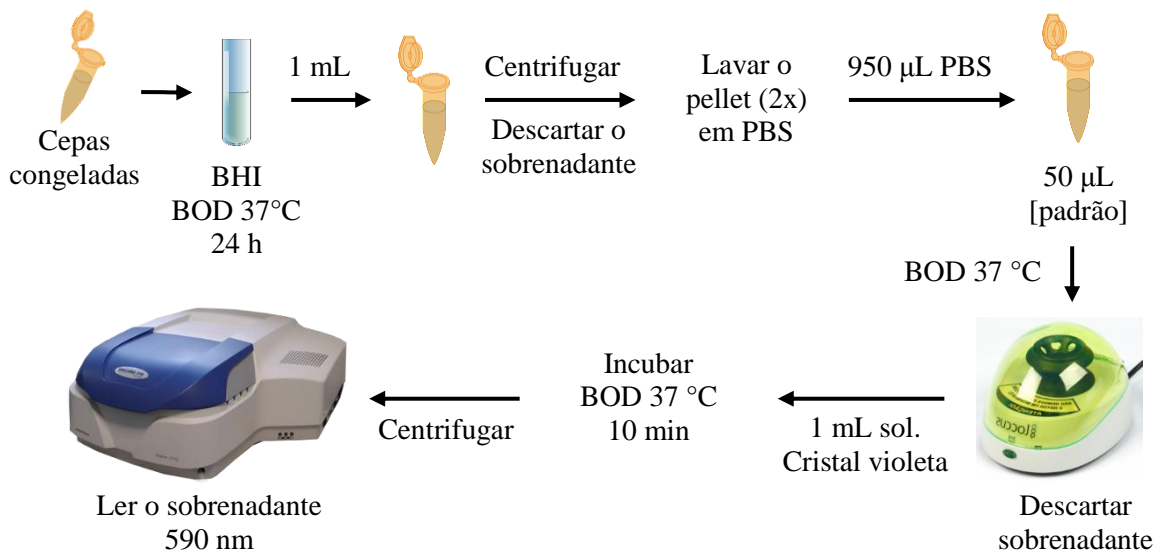
Fonte: Do autor (2019).

3.2.8 Avaliação da permeabilidade da membrana de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

A porcentagem de absorção de cristal violeta pelas bactérias foi determinada conforme metodologia descrita por Devi et al. (2010), com pequenas modificações. Os microrganismos foram inoculados em caldo BHI e incubados em BOD por 24 horas a 37 °C. Após esse período, as suspensões foram homogeneizadas e 1 mL do inóculo foi transferido para microtubos estéreis. A solução foi centrifugada em minicentrífuga (Loccus NanoSpin 8) a

aproximadamente 2000 x g, por 5 minutos; o sobrenadante foi descartado e o pellet (células bacterianas) foi lavado duas vezes em tampão fosfato salino – PBS (0,01 M pH 7,4; Sigma-Aldrich). Em seguida, adicionaram-se aos microtubos, 950 µL de PBS e 50 µL de padrão diluído em DMSO, na concentração de 2 x CMI. Agitaram-se e incubaram-se os tratamentos em BOD a 37 °C por 60 minutos. Transcorrido esse tempo, centrifugaram-se novamente as suspensões e descartaram-se os sobrenadantes. As células foram ressuspensas em 1,5 mL de solução de cristal violeta/ PBS 10 µg mL⁻¹ (Violeta de metila, 97%, Vetec) e incubadas por 10 minutos. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas, o sobrenadante foi diluído em 1,5 mL de tampão fosfato e foram realizadas as leituras de absorbância. A absorção de cristal violeta pelas células bacterianas não tratadas foi avaliada empregando-se apenas o microrganismo e tampão PBS. Para realização das leituras, utilizou-se um espectrofotômetro Specord 200 Plus (Analytik Jena AG Germany), no comprimento de onda de 590 nm (FIGURA 27). A absorbância de uma solução de cristal violeta/ PBS (10 µg mL⁻¹) diluída em tampão (na mesma proporção que os tratamentos) foi considerada como contendo 100% de cristal violeta (CV) livre. O experimento foi conduzido em quatro repetições.

Figura 27 – Esquema da metodologia de absorção de cristal violeta.



Fonte: Do autor (2019).

A porcentagem de cristal violeta livre (CV) em solução (não absorvido pelas células) foi calculada de acordo com a fórmula a seguir:

$$\% \text{ CV livre} = \frac{100 \times \text{Absorbância da amostra}}{\text{Absorbância da solução de CV}} \quad (1)$$

A partir dos resultados obtidos na Equação 1, calculou-se a porcentagem de cristal absorvida, conforme Equação 2.

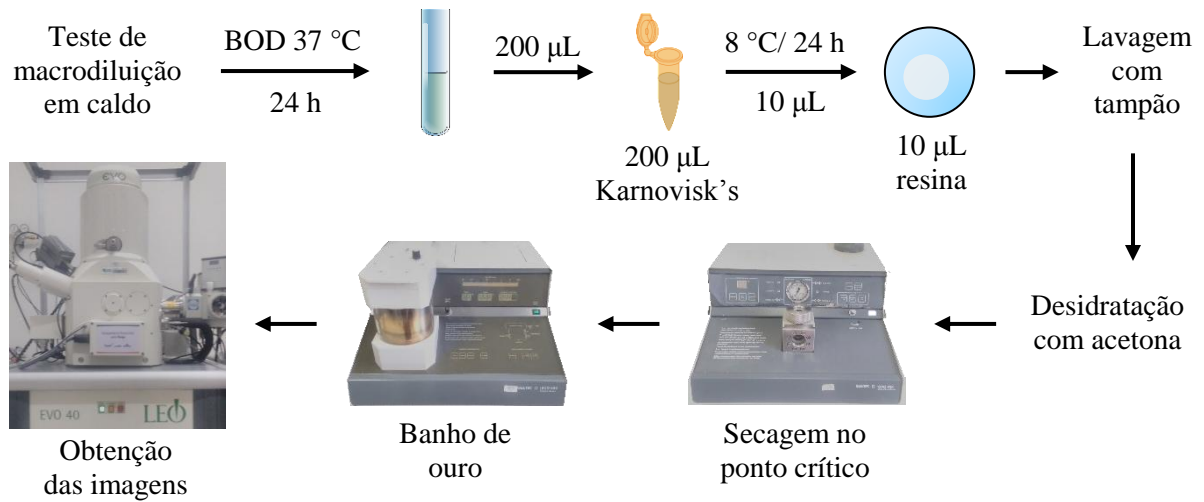
$$\% \text{ CV absorvida} = 100 - \% \text{ CV livre} \quad (2)$$

3.2.9 Avaliação morfológica de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

Na análise das alterações morfológicas causadas pelos padrões nos microrganismos *E. coli* e *S. aureus*, os tratamentos foram preparados conforme o ensaio de macrodiluição descrito anteriormente, nas concentrações equivalentes à mínima inibitória e bactericida (para os casos em que a CMI diferiu da CMB). Após 24 h de incubação a 37 °C, as suspensões foram agitadas (agitador tipo vórtex, Vertex QL – 901) e 200 µL das amostras foram transferidos para microtubos eppendorfs. Em seguida, adicionaram-se 200 µL de solução fixadora Karnovisk's (10 mL de glutaraldeído 25%; 10 mL de paraformaldeído 16%; 25 mL de tampão cacodilato de sódio 0,2 M pH 7,2; 1 mL de cloreto de cálcio 0,1 M e 56 mL de água destilada). As amostras foram mantidas por 24 horas sobre refrigeração a aproximadamente 8 °C. Transcorrido esse período, 10 µL dos tratamentos fixados foram adicionados a uma lamínula contendo 10 µL de poli-L-lisina 0,5%; e secos ao ar por 20 minutos. Posteriormente, a lamínula foi lavada com tampão cacodilato de sódio (0,05 M pH 7,2) e desidratada pela exposição a uma série de soluções, com concentração crescente de acetona (25, 50, 75, 90 e 100%). As amostras foram secas em aparelho de ponto crítico (Bal-tec CPD 030) e pulverizadas com ouro (Bal-tec SCD 050) (FIGURA 28) (OLIVEIRA, M. et al., 2010).

As imagens (eletromicrografias) foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura (EVO 040 Leo).

Figura 28 – Esquema simplificado da metodologia de preparo das amostras para MEV.



Fonte: Do autor (2019).

3.3 Análise estatística

Os dados registrados nos ensaios biológicos de capacidade de tolerância a sal, liberação de constituintes celulares e absorção de cristal violeta pelos microrganismos foram avaliados estatisticamente pelo Teste Q, para exclusão de réplicas anômalas, com 99% de confiança. Os valores aceitos no teste de rejeição foram adequadamente transformados, conforme metodologia aplicada experimentalmente, e submetidos à análise de variância, empregando-se o teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de significância, no programa estatístico Sisvar (versão 5.6.86) (FERREIRA, 2011). Os resultados obtidos no teste de liberação de constituintes celulares foram pré-processados antes da análise de variância, por normalização das amostras, valendo-se de uma matriz tratamento \times tempo de incubação, no aplicativo Octave (versão 4.0.0). O desvio padrão das médias foi calculado no programa Exel (pacote Microsoft Office Professional Plus 2016) e utilizado como parâmetro para avaliação da dispersão dos dados e precisão dos resultados. Para melhor comparação dos resultados, gráficos foram plotados no mesmo programa.

A fim de caracterizar a atividade biológica das amostras conforme os tratamentos empregados, os dados foram submetidos ainda à análise do reconhecimento de padrões, pela técnica de Agrupamento Hierárquico (HCA), no programa Octave (EATON; BATEMAN; HAUBERG, 1997). Para avaliação dos padrões de forma geral (resultados obtidos em todos ensaios biológicos), foi realizado pré-processamento das amostras, aplicando algoritmo para centralização das variáveis na média.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação da concentração mínima inibitória e bactericida dos terpenos e fenilpropanoides (padrões) sobre *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

A concentração mínima inibitória (CMI) e a concentração mínima bactericida (CMB) dos terpenos e fenilpropanoides estudados (padrões) e do cloranfenicol sobre os microrganismos *E. coli* e *S. aureus* são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Concentração mínima inibitória e bactericida das amostras.

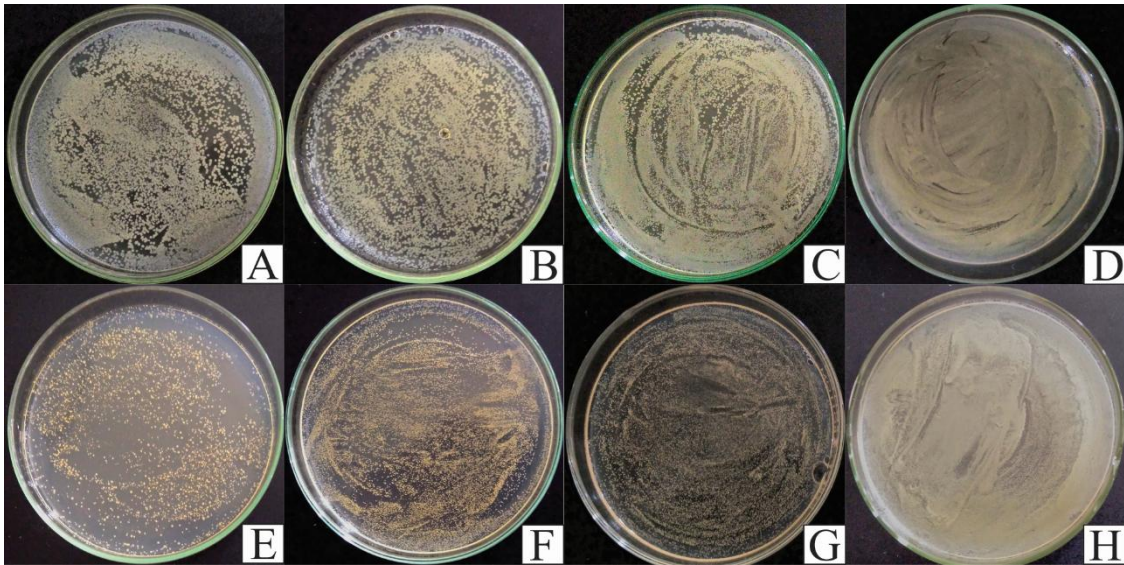
Amostra	<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
	CMI ¹	CMB ¹	CMI ¹	CMB ¹
Carvacrol	0,38	0,38	0,38	0,38
<i>Trans</i> -cinamaldeído	0,41	0,41	0,41	1,64
Eugenol	0,84	0,84	0,84	1,67
Carvona	1,50	1,50	1,50	1,50
β -citronelol	NI ²	NI ²	0,33	0,33
Limoneno	NI ²	NI ²	21,00	21,00
Cloranfenicol	125,00	NI ²	250,00	NI ²
Dimetilsulfóxido	NI	NI	NI	NI

Legenda: NI: não inibiu o desenvolvimento bacteriano; ¹Concentração em unidades de $\mu\text{g mL}^{-1}$; ²Na faixa de concentração empregada. Fonte: Do autor (2019).

É possível notar que os terpenos e fenilpropanoides empregados foram mais eficientes no controle das cepas bacterianas, quando comparados ao antibiótico cloranfenicol. O cloranfenicol atua ligando-se à subunidade 30S do ribossomo. Seu mecanismo de ação parece envolver a inibição da peptidil transferase, enzima responsável pela extensão da cadeia peptídica, interferindo na síntese proteica. Esse antibiótico age principalmente como bacteriostático e possui espectro de ação que engloba microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, sendo empregado em medicamentos como soluções oftalmológicas (4 ou 5 mg mL⁻¹); cápsulas (250 mg), drágeas (500 mg) ou comprimidos (500 mg) (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). Miranda et al. (2016), utilizando a metodologia de difusão em cavidade ágar, demonstraram que o cloranfenicol pode inibir o desenvolvimento de *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes* e *Salmonella Choleraesuis*, na

concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. No presente trabalho, a CMI identificada para o antibiótico foi superior à obtida por Miranda et al. (2016), o que pode estar relacionado à metodologia empregada para avaliação do potencial antibacteriano. Além disso, o cloranfenicol apresentou apenas efeito bacteriostático e não causou mortalidade nas cepas de *E. coli* e *S. aureus*, na faixa de concentração testada ($0,09$ a $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$), como pode ser observado nas imagens da Figura 29.

Figura 29 – Resultados para os ensaios biológicos de CMB do antibiótico cloranfenicol.



Legenda: *E. coli* tratada com cloranfenicol na concentração de: A: $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$; B: $500 \mu\text{g mL}^{-1}$; C: $250 \mu\text{g mL}^{-1}$; D: $125 \mu\text{g mL}^{-1}$. *S. aureus* tratada com cloranfenicol na concentração de: E: $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$; F: $500 \mu\text{g mL}^{-1}$; G: $250 \mu\text{g mL}^{-1}$; H: $125 \mu\text{g mL}^{-1}$. Desenvolvimento após 48 h de tratamento e incubação à 37°C . Fonte: Do autor (2019).

A concentração mínima inibitória dos compostos carvacrol, *trans*-cinamaldeído, eugenol e carvona variou de $0,38$ a $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ para os microrganismos avaliados. Esses resultados diferem dos dados encontrados na literatura para o potencial bacteriostático dos padrões, registrados na Tabela 4. Em relação ao β -citronelol, Romero et al. (2015) relataram inibição no desenvolvimento de *E. coli* na concentração de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, discordando do obtido neste trabalho, no qual não foi identificada inibição. Para o composto limoneno, van Vuurem e Viljoen (2007) observaram efeito inibitório sobre a mesma bactéria em concentrações superiores à faixa empregada, o que pode explicar a ausência de uma CMI neste estudo.

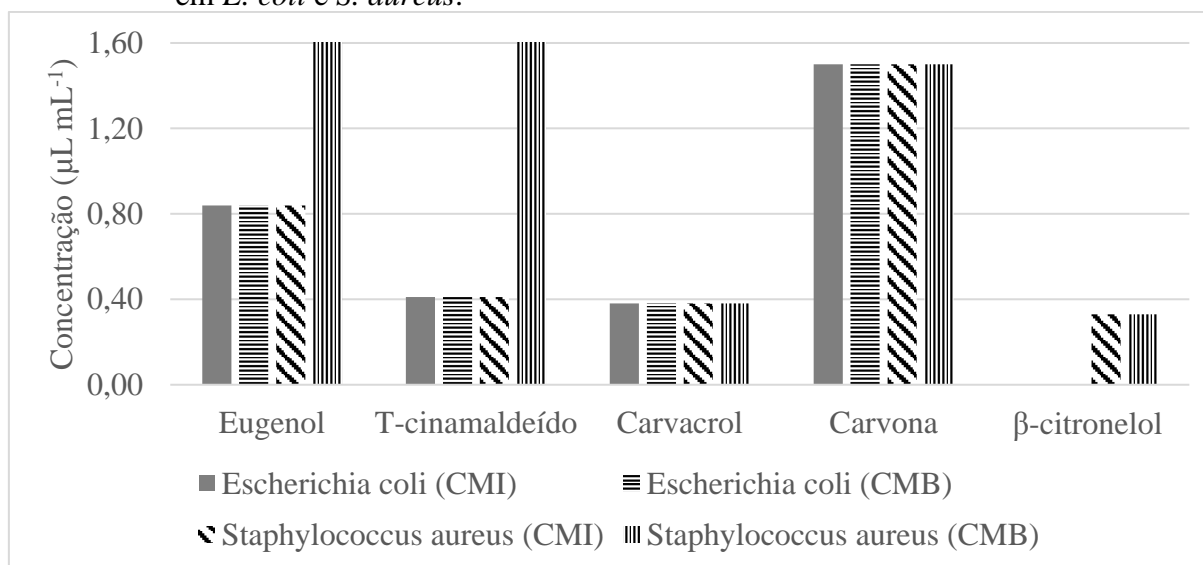
De modo geral, observa-se maior sensibilidade para as cepas de *E. coli* (exceto para β -citronelol e limoneno) e *S. aureus* investigadas neste trabalho, em comparação às outras pesquisas, evidenciado por menores concentrações inibitórias. Essas diferenças são compreensíveis, uma vez que se trata de cepas de origens e perfis de resistência distintos.

Tabela 4 – Registros bibliográficos de concentração mínima inibitória para os padrões com maior atividade antibacteriana.

Amostra	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Carvacrol	7,6 mg mL ⁻¹⁽¹⁾ ; 300 µg mL ⁻¹⁽²⁾	64 µg mL ⁻¹⁽³⁾ ; 3,8 mg mL ⁻¹⁽¹⁾
<i>Trans</i> -cinamaldeído	300 µg mL ^{-1(2,4)}	300 µg mL ⁻¹⁽²⁾ ; 250 µg mL ⁻¹⁽⁴⁾
Eugenol	66,9 mg mL ⁻¹⁽¹⁾ ; 1,3 mg mL ⁻¹⁽²⁾	33,4 mg mL ⁻¹⁽¹⁾ ; 256 µg mL ⁻¹⁽³⁾
Carvona	5 mg mL ⁻¹⁽⁵⁾ ; 200 µg mL ⁻¹⁽⁶⁾	2,5 mg mL ⁻¹⁽⁵⁾ ; 7,5 mg mL ⁻¹⁽¹⁾
β-citronelol	5 µg mL ⁻¹⁽⁶⁾	375 µg mL ⁻¹⁽⁶⁾
(-) e (+) Limoneno	8 e 11 mg mL ⁻¹⁽⁷⁾	4 e 13 mg mL ⁻¹⁽⁷⁾

Legenda: 1: Gallucci et al. (2009); 2: Ye et al. (2013); 3: Miladi et al. (2017); 4: Ooi et al. (2006); 5: Porto et al. (2010); 6: Romero et al. (2015); 7: van Vuuren; Viljoen (2007). Fonte: Do autor (2019).

Na Figura 30, está representada a relação entre a CMI e CMB das amostras que apresentaram melhor resposta nos ensaios antibacterianos. De acordo com esses resultados, pode-se inferir que os compostos aromáticos oxigenados (com presença de grupos aldólicos, cetônicos, éter, fenólicos ou ácidos) constituem melhores antimicrobianos, precedidos por compostos derivados de terpenos alifáticos oxigenados. Para os monoterpenos, a presença de grupos cetônicos proporcionaram maior atividade, quando comparados a hidroxilas ou substituintes alquila. O monoterpeno carvacrol (monoterpeno com características fenólicas) foi o constituinte que exibiu maior potencial biológico, seguido de *trans*-cinamaldeído (aldeído aromático); eugenol (éster/ fenol); carvona (cetona); β-citronelol (álcool) e limoneno (alqueno).

Figura 30 – Comparação entre CMI e CMB dos padrões com maior potencial antibacteriano em *E. coli* e *S. aureus*.

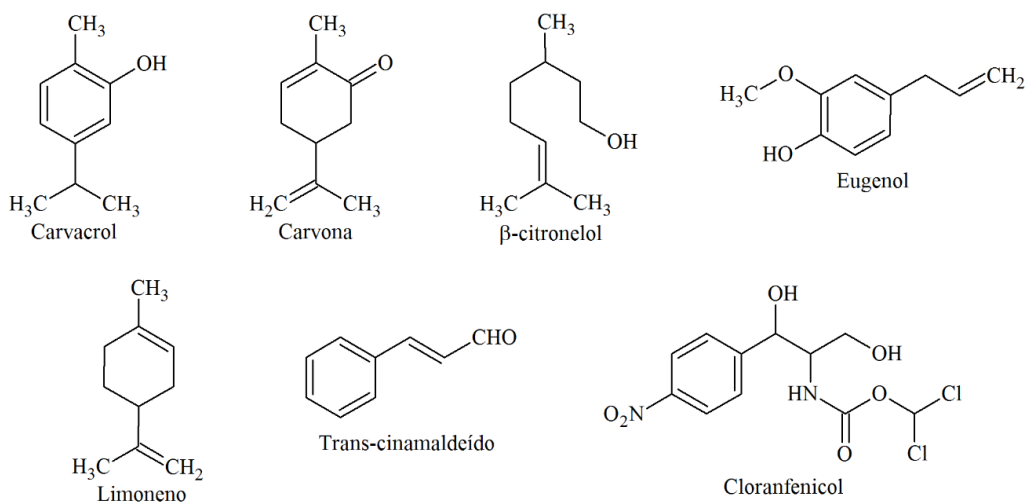
Fonte: Do autor (2019).

O esqueleto carbônico de terpenos e fenilpropanoides (essencialmente lipofílicos) possui grande afinidade pela porção lipídica das membranas plasmáticas. No entanto, a presença de grupos polares com características hidrofílicas é importante para a ação antimicrobiana dos óleos essenciais, pois desempenham papel fundamental nos mecanismos de interação que o composto poderá realizar com estruturas polares da célula, como proteínas e carboidratos (SAAD; MULLER; LOBSTEIN, 2013). Isso foi constatado experimentalmente pela baixa atividade antibacteriana verificada para o monoterpeneo limoneno.

Corroborando com essas conclusões, Kalemba e Kunicka (2003) sugerem que a atividade biológica dos componentes de óleos essenciais decresce na seguinte ordem: fenóis, aldeídos, cetonas, álcoois, éteres e hidrocarbonetos. Analisando a estrutura desses grupos, é fácil compreender a ordem de atividade. Todos os compostos podem realizar interações hidrofóbicas, como dipolo-induzido. Os éteres, cetonas e aldeídos formam ligações de hidrogênio como aceptores de próton, e os álcoois e fenóis são aceptores e doadores de próton. Além disso, a presença do oxigênio resulta na formação de polos, permitindo interações do tipo dipolo-dipolo. Adicionalmente, os fenóis realizam todas essas interações, além de π -stacking. Assim, a atividade de um composto pode ser estimada pela quantidade e eficiência das interações intermoleculares que ele forma.

As estruturas químicas dos padrões sintéticos testados estão representadas na Figura 31. Ao contrário do exposto por Kalemba e Kunicka (2003), o composto β -citronelol demonstrou atividade bactericida em *S. aureus* quatro vezes maior, contraposto à carvona. Provavelmente, isso pode estar relacionado às interações efetuadas pelo grupo hidroxila. Outro fator que pode diminuir a atividade da cetona é a rigidez estrutural (devido à presença do ciclo). Por se tratar de uma cadeia cíclica que assume duas conformações (cadeira ou bote), as interações entre a carvona e grupos do sítio ativo se tornam limitadas e dependentes do encaixe da molécula. Para o composto β -citronelol, as possibilidades de interação são maiores, devido à presença de ligações simples rotacionáveis, que podem assumir diferentes conformações, proporcionando melhor encaixe no sítio biológico. Apesar disso, esse constituinte foi ineficaz no controle de *E. coli*, fortalecendo a hipótese de que seu alvo de ação é específico ou tem maior impacto na sobrevivência de bactérias Gram-positivas.

Figura 31 – Estrutura química dos padrões testados e do cloranfenicol.



Fonte: Do autor (2019).

A menor atividade do constituinte eugenol em relação ao carvacrol pode ser associada à presença de substituintes volumosos no anel aromático (grupos $-OCH_3$ e $-CH_2CHCH_2$), que podem dificultar o encaixe e a interação entre a molécula e os sítios biológicos. A proximidade entre os grupos hidroxila e éter na molécula de eugenol também pode influenciar a atividade desse composto, pois permite a formação de uma interação de hidrogênio intramolecular, o que torna esses substituintes indisponíveis para a realização de interações com biomoléculas.

Comparativamente ao limoneno, β-citronelol e carvona, os compostos benzenoides estudados exibiram maior potencial antimicrobiano, já que foram capazes de causar efeito bactericida para ambas as cepas avaliadas, apresentando um espectro de ação mais amplo. É pertinente pressupor que essa atividade esteja ligada à natureza ácida do grupo hidroxila nas estruturas fenólicas (KALEMBA; KUNICKA, 2003) ou às interações do tipo π -stacking realizadas pelo anel aromático.

Das espécies bacterianas em estudo, *Staphylococcus aureus* foi mais sensível às amostras. A estrutura da parede de uma célula Gram-positiva consiste basicamente na presença de uma membrana plasmática revestida por uma camada espessa de peptidoglicana. Em contraste, bactérias Gram-negativas possuem uma parede de peptidoglicana mais fina, envolta por uma membrana externa adicional (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). A simplicidade estrutural da parede celular de um microrganismo Gram-positivo em relação a um Gram-negativo pode explicar a diferença de sensibilidade para as cepas testadas, uma vez que esse modelo permite que as substâncias penetrem mais facilmente nas células.

A menor susceptibilidade de espécies Gram-negativas à ação de antibióticos é atribuída por muitos pesquisadores à presença da membrana externa, que atua como barreira extra à

permeabilidade de macromoléculas e compostos hidrofóbicos. Pequenas substâncias polares são capazes de penetrar a célula por ação de proteínas transportadoras. Contudo, um composto hidrofóbico deve realizar interações com a porção polar e ter afinidade pela porção lipídica para transpor a membrana. Assim, a passagem de moléculas lipossolúveis é dificultada devido à presença de duas membranas fosfolipídicas e à baixa afinidade com a superfície hidrofílica da membrana, rica em lipopolissacarídeos ou lipoproteínas. Há ainda a presença do periplasma, que representa outra proteção natural da célula à entrada de antimicrobianos. Esse fato pode explicar a ausência de atividade antibacteriana dos compostos limoneno e β -citronelol para *E. coli*. A característica apolar do limoneno também pode causar resistência à passagem desse constituinte pelas membranas Gram-positivas, resultando na baixa atividade observada sobre *S. aureus* (KALEMBA; KUNICKA, 2003; MIRANDA et al, 2016; NAZZARO et al., 2013).

Nos tópicos a seguir, serão discutidos os possíveis mecanismos de ação dos compostos que apresentaram melhor atividade antibacteriana sobre *E. coli* (carvacrol, eugenol, *trans*-cinamaldeído e carvona) e *S. aureus* (carvacrol, eugenol, *trans*-cinamaldeído, carvona e β -citronelol), com base nos resultados obtidos nos testes de liberação de íons potássio, tolerância a sal, liberação de constituintes celulares e absorção de cristal violeta.

4.2 Avaliação da influência dos padrões na liberação de íons potássio por *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

Antibióticos capazes de atuar na membrana citoplasmática e em suas estruturas podem gerar a perda da integridade ou funcionalidade, alterando, por exemplo, o fluxo normal de íons pela membrana. Para estudar a influência dos padrões na membrana celular bacteriana, avaliou-se o extravasamento de íons potássio causado pelo tratamento dos microrganismos com a concentração bactericida dos padrões monoterpênicos e fenilpropanoides.

A membrana plasmática constitui uma barreira entre o meio externo e interno da célula; alterações em sua integridade podem ocasionar diferentes efeitos negativos, desde extravasamento de íons ou macromoléculas, até lise e morte celular. Um indicativo de danos à estrutura da membrana é a perda de eletrólitos resultante de alterações em sua permeabilidade ou funcionalidade dos canais iônicos (proteínas integrais de membrana que carregam a passagem de cátions, ânions ou pequenas moléculas polares) (SHEN et al.,2015).

Os ensaios biológicos para mensurar o efluxo de íons potássio se basearam em leituras da concentração de potássio presente no meio de cultura, em diferentes intervalos de incubação. Partindo do princípio de que os óleos essenciais atuam sobre a parede celular bacteriana, direta

ou indiretamente, verificar-se-ia um aumento na concentração de potássio no meio de cultura ao longo do tempo, correspondendo à perda de íons pelas células. Os resultados obtidos estão registrados nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 5 – Liberação de íons potássio (em mg L⁻¹) em *E. coli* em diferentes horários de incubação.

Amostra	0 horas	2 horas	4 horas	6 horas	24 horas
Carvacrol	400	400	400	400	400
<i>Trans</i> -cinamaldeído	400	400	400	400	400
Eugenol	400	400	400	400	400
Carvona	400	400	400	400	400
<i>E. coli</i> (controle)	400	400	400	700	700

Fonte: Do autor (2019).

Tabela 6 – Liberação de íons potássio (em mg L⁻¹) em *S. aureus* em diferentes horários de incubação.

Amostra	0 horas	2 horas	4 horas	6 horas	24 horas
Carvacrol	400	400	400	400	400
<i>Trans</i> -cinamaldeído	400	400	400	400	400
Eugenol	400	400	400	400	400
Carvona	400	400	400	400	400
β-citronelol	400	400	400	400	400
<i>S. aureus</i> (controle)	400	400	400	400	400

Fonte: Do autor (2019).

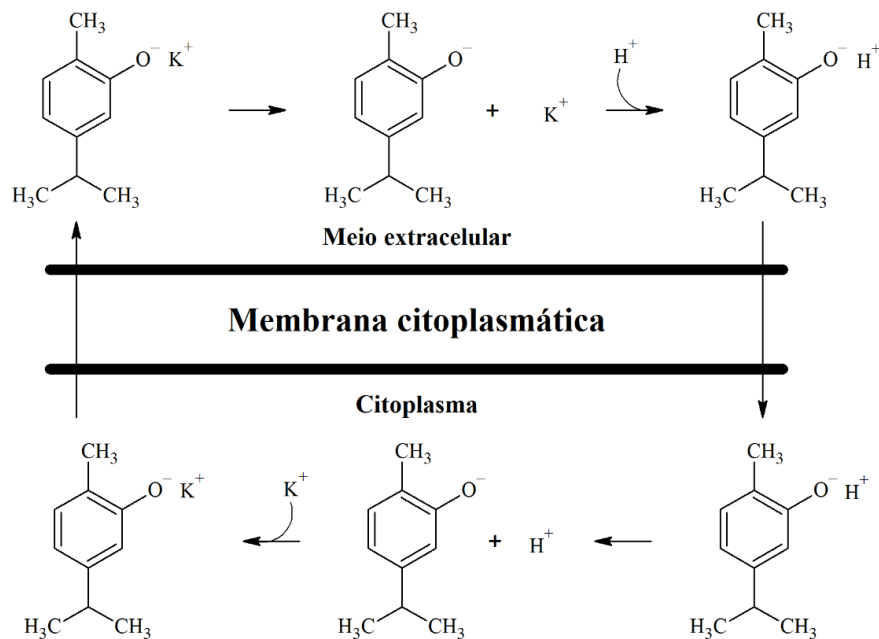
No meio puro (caldo Mueller-Hinton), foram quantificados 400 mg L⁻¹ de íons K⁺ em solução.

A concentração de potássio permaneceu constante ao longo do tempo para os tratamentos com os terpenos e fenilpropanoides. Esse fato é um forte indício de que o mecanismo de ação dos padrões em estudo não está relacionado a danos severos na membrana plasmática, tais como rompimento da estrutura, grandes alterações na permeabilidade ou integridade.

Compostos fenólicos, como carvacrol e eugenol, apresentam certa acidez devido à estabilização do ânion fenóxido (base conjugada) pela deslocalização da carga. Ultee, Bennik e Moezelaar (2002) propuseram um mecanismo para transporte de íons potássio intermembrana pela molécula de carvacrol (FIGURA 32). Esse mecanismo está baseado na ionização do

carvacrol e interação eletrostática entre o ânion formado e os íons K^+ . Em pH 7, correspondente ao pH aproximado do caldo Mueller-Hinton utilizado no teste, apenas 0,1% da espécie encontra-se ionizada, ou seja, uma fração muito pequena do carvacrol sofrerá perda do próton e participará do mecanismo proposto para efluxo de potássio. Em razão disso, o aumento extracelular desse íon pode ter ocorrido em quantidades discretas; não sendo possível, desse modo, quantificar as variações pelo Kit Cálcio/ Potássio, refletindo nos valores constantes registrados nas Tabelas 5 e 6.

Figura 32 – Esquema de um provável mecanismo de ação antibacteriano para o carvacrol.



Fonte: Adaptado de Ultee, Bennik, Moezellar (2002).

Entretanto, foi verificado um aumento nos níveis de K^+ extracelulares no tratamento-controle para *E. coli*, a partir de 6 horas de incubação. Sabe-se que o desenvolvimento bacteriano ocorre de forma exponencial. Assim, a rápida multiplicação do microrganismo, acompanhada da morte natural, pode ter gerado liberação de íons em algum momento do ciclo celular. Essa elevação na perda de potássio por *E. coli* não foi observada nos tratamentos com os padrões, provavelmente porque a ação dos óleos impediu a multiplicação bacteriana em tempo hábil, evitando que o microrganismo proliferasse demasiadamente como ocorreu nos tubos-controle.

Além disso, para os tratamentos-controle de *S. aureus*, também não houve extravasamento de íons. Essas diferenças entre os resultados obtidos para ambos os

microrganismos são aceitáveis, uma vez que se trata de espécies diferentes, principalmente na estrutura de suas paredes celulares.

4.3 Avaliação da influência dos padrões na capacidade de tolerância a sal de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

As membranas bacterianas são extremamente permeáveis à água; contudo, não possuem mecanismos para induzir o fluxo desse composto entre os meios intra e extracelulares, logo são sensíveis a diferentes gradientes de concentração salina. Consequentemente, a passagem de água pela membrana plasmática ocorre por um processo passivo, controlado pelo gradiente de espécies osmoticamente ativas. Para manter o equilíbrio com o ambiente e assegurar condições necessárias para seu desenvolvimento, as células bacterianas armazenam solutos no citoplasma, o que direciona o fluxo de água para o interior da célula. Esses solutos podem ser moléculas orgânicas relativamente inertes que não afetam o metabolismo, oriundas da acumulação controlada a partir do ambiente externo ou por síntese no próprio citoplasma. Quando os microrganismos são transferidos para um meio saturado, ocorre um choque hiperosmótico, desencadeando a saída de água da célula para o meio e encolhimento celular, até que seja restituído o equilíbrio osmótico. Em condições extremas, a alteração do fluxo passivo de água pode causar a morte por desidratação ou lise celular (O'BYRNE; BOOTH, 2002).

Antibióticos que acarretam alterações severas nas membranas bacterianas podem levar ao aumento na permeabilidade e afetar a osmorregulação, dificultando a sobrevivência dos microrganismos em ambientes com altas concentrações salinas (MIKSUSANTI et al., 2008), seja pela facilitação da entrada de solutos ou água, seja pela redução do conteúdo de moléculas osmoticamente ativas; a perda da capacidade de tolerância a sais ou a diminuição na capacidade de formação de colônias pode ser empregada para revelar efeitos lesivos às membranas.

A influência dos padrões na permeabilidade da membrana celular de *E. coli* e *S. aureus* foi determinada saturando-se o meio de cultura com diferentes concentrações de íons e empregando uma concentração equivalente à metade da CMI. Na concentração mínima inibitória (que, em alguns casos, foi igual à CMB), não houve crescimento de colônias suficientes estatisticamente para estimar a influência das amostras.

Nos ensaios com meio ágar Mueller-Hinton suplementado com 5% de NaCl, não foi detectado desenvolvimento de colônias de *E. coli*, sendo essa cepa mais sensível à elevação do nível salino do que *S. aureus*. Esse fato pode estar relacionado à diminuição da atividade de água (a_w) do meio com o incremento da concentração de soluto. De acordo com Batista (2014),

estafilococos se desenvolvem bem em alimentos que contêm atividade de água de 0,83; ao passo que *E. coli* necessita de uma a_w de, no mínimo, 0,95. Além disso, estudos relatam a capacidade de *Staphylococcus* sp. em sobreviver a concentrações de sal de até 15% (SANTANA et al., 2010).

Pela análise dos dados da Tabela 7, fica perceptível a redução estatística no número de colônias de *E. coli* causada pelo carvacrol, para ambas as concentrações salinas; e pelo eugenol, na concentração de 2,5 % de NaCl. Nota-se ainda que o único padrão capaz de causar diminuição significativa no número de colônias com aumento da concentração salina foi o carvacrol (de aproximadamente 10^5 UFC mL⁻¹, em NaCl 0%, para 10^4 UFC mL⁻¹, em NaCl 2,5%). De acordo com esses resultados, pode-se inferir que os constituintes carvacrol e eugenol afetam, direta ou indiretamente, o equilíbrio osmótico ou a membrana plasmática de *E. coli*.

Tabela 7 – Influência dos padrões na capacidade de tolerância a sal de *E. coli*.

Amostra	Contagem de colônias [log (UFC mL ⁻¹)]	
	0% NaCl ¹	2,5% NaCl ¹
Carvacrol	5,14 ± 0,17 aB	4,84 ± 0,45 aA
<i>Trans</i> -cinamaldeído	5,70 ± 0,005 bA	5,48 ± 0,10 cA
Eugenol	5,42 ± 0,19 bA	5,27 ± 0,16 bA
Carvona	5,60 ± 0,13 bA	5,53 ± 0,13 cA
<i>E. coli</i>	5,62 ± 0,12 bA	5,70 ± 0,07 cA

Legenda: ¹Médias precedidas do desvio padrão; letras **minúsculas** iguais na **coluna** não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância; letras **maiúsculas** iguais na **linha** não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância. Fonte: Do autor (2019).

Concomitantemente, relacionando os dados obtidos nos testes de liberação de íons potássio aos valores de log (UFC mL⁻¹) inalterados estatisticamente em relação ao controle *E. coli*, pode-se inferir que a ação dos compostos *trans*-cinamaldeído e carvona parece não estar ligada a alterações na estrutura da membrana plasmática. Essas constatações sugerem que seu alvo de ação seja intracelular, no citoplasma ou nas enzimas citoplasmáticas, conforme os possíveis mecanismos ilustrados na Figura 16 (página 44), apresentada anteriormente. Já os compostos eugenol e carvacrol (principalmente) parecem diminuir a capacidade osmorregulatória ou afetar o conteúdo de solutos osmoticamente ativos, pois causaram redução significativa no número de células viáveis.

Na Tabela 8, estão registrados os resultados obtidos para os ensaios de tolerância a sal para a cepa de *S. aureus* com e sem tratamento. O composto que apresentou maior influência na formação e sobrevivência das colônias foi β -citronelol, reduzindo o número de células em todas as concentrações, de aproximadamente 10^4 UFC mL⁻¹, no controle, para 10^3 UFC mL⁻¹, no tratamento.

Tabela 8 – Influência dos padrões na capacidade de tolerância a sal de *S. aureus*.

Amostra	Contagem de colônias [log (UFC mL ⁻¹)]		
	0% NaCl ¹	2,5% NaCl ¹	5% NaCl ¹
Carvacrol	4,88 ± 0,09 bA	4,81 ± 0,23 bA	4,84 ± 0,12 bA
<i>Trans</i> -cinamaldeído	5,02 ± 0,25 bA	5,29 ± 0,24 cB	5,22 ± 0,19 cB
Eugenol	5,12 ± 0,19 cA	5,13 ± 0,19 cA	4,99 ± 0,21 bA
Carvona	5,20 ± 0,13 cA	5,19 ± 0,11 cA	5,12 ± 0,18 cA
β -citronelol	3,37 ± 0,22 aA	3,38 ± 0,11 aA	3,26 ± 0,24 aA
<i>S. aureus</i>	4,90 ± 0,13 bA	4,95 ± 0,17 bA	4,92 ± 0,15 bA

Legenda: ¹Médias precedidas do desvio padrão; letras **minúsculas** iguais na **coluna** não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância; letras **maiúsculas** iguais na **linha** não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância. Fonte: Do autor (2019).

Os padrões carvona, *trans*-cinamaldeído e eugenol apresentaram efeito contrário ao esperado, causando aumento na sobrevivência das colônias de *S. aureus*, comparado ao controle. Esse fato pode estar relacionado à concentração empregada para esses compostos (equivalente a ½ da CMB da carvona, ⅓ da CMB do *trans*-cinamaldeído; e ¼ da CMB do eugenol). Possivelmente, esses compostos têm influência positiva no teor de solutos osmoticamente ativos ou na permeabilidade da membrana bacteriana, o que permitiu aumento na taxa de sobrevivência dos microrganismos em meios hipertônicos.

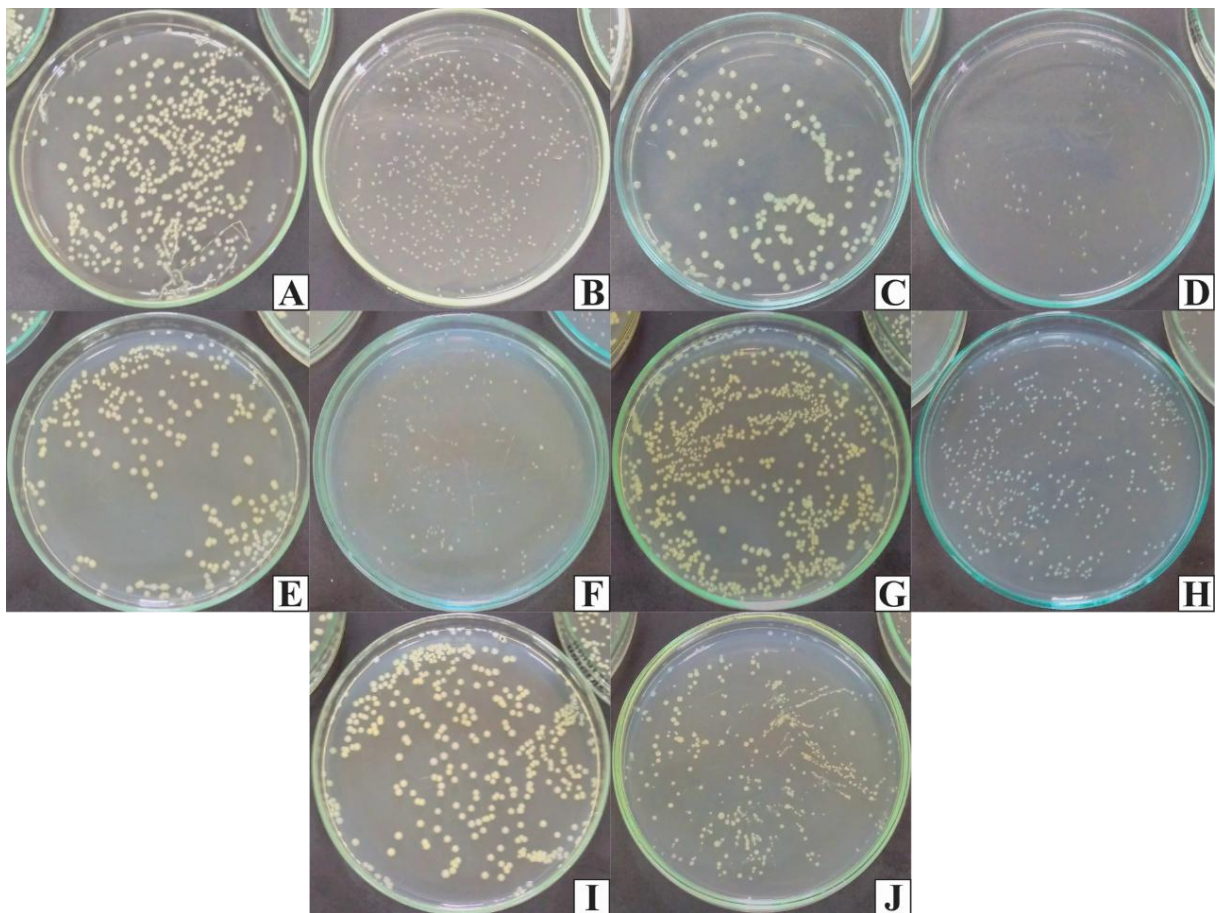
Antagonicamente ao observado para *E. coli*, o padrão carvacrol não afetou de modo significativo a capacidade de tolerância a sal de *S. aureus*, apresentando valores de log (UFC mL⁻¹) similares ao controle.

Retomando os resultados obtidos no teste de liberação de íons potássio aditivamente ao teste de tolerância a sal, observa-se que os compostos carvacrol, carvona, *trans*-cinamaldeído e eugenol aparentemente não causam efeitos deletérios à permeabilidade da membrana de *S. aureus*, uma vez que não houve liberação de K⁺ ou redução nas unidades formadoras de colônia presentes nos tratamentos em relação ao controle. O constituinte β -citronelol, por sua vez,

provavelmente atua em mecanismos que implicam a perda da capacidade osmorregulatória, a perda da funcionalidade da membrana ou alterações no conteúdo de metabólitos osmoticamente ativos. Além disso, observa-se ainda que o composto parece apresentar maior potencial antibacteriano que os demais. Essas suposições são pertinentes, uma vez que o β -citronelol causou diminuição significativa no número de células viáveis, inclusive no plaqueamento com meio não suplementado (0% NaCl).

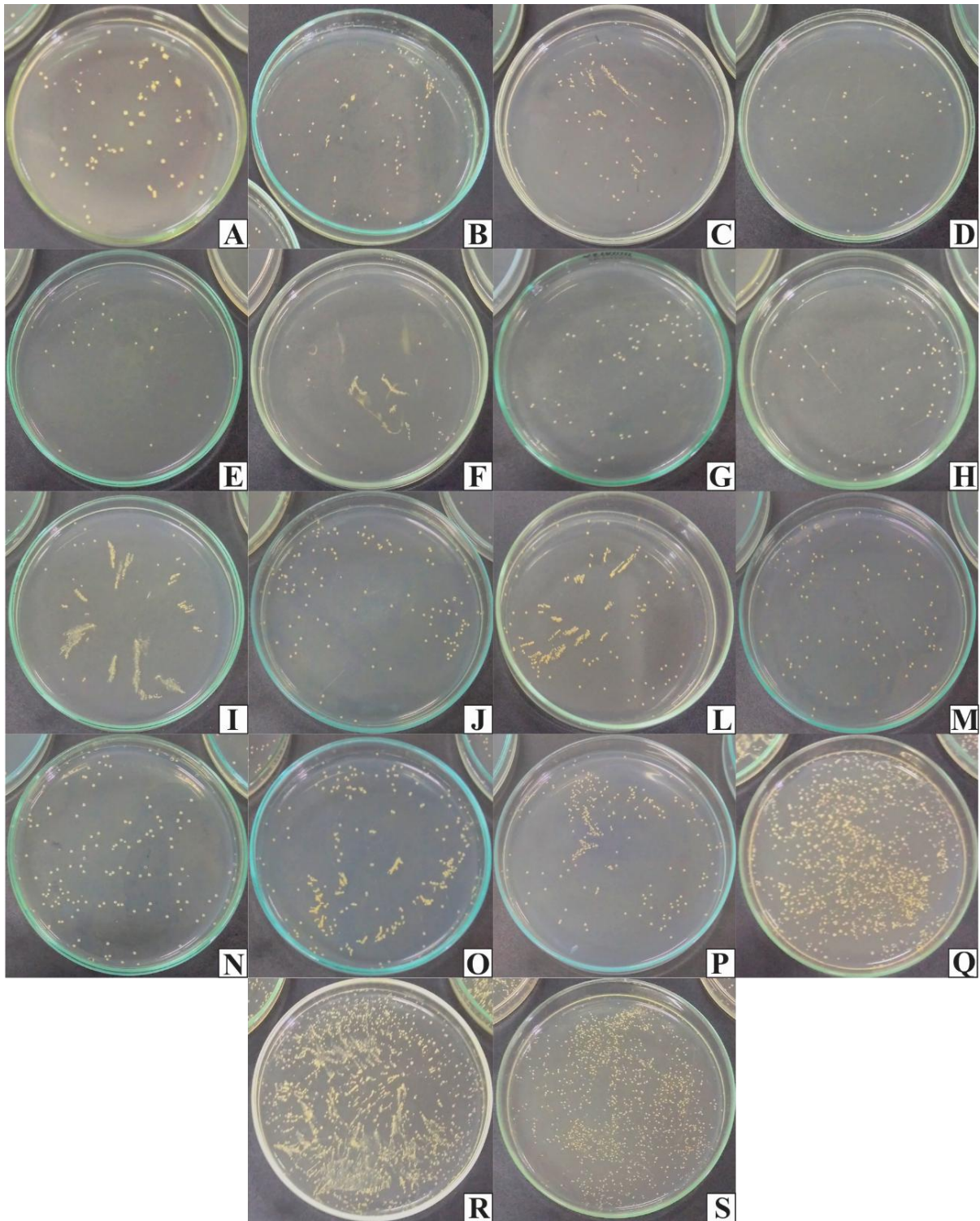
Qualitativamente, foi possível notar diminuição no diâmetro das colônias de *E. coli* inoculadas em meio ágar Mueller-Hinton saturado com 2,5% de sal, em todos os tratamentos (FIGURA 33). Isso pode ter ocorrido devido à saída de água das células bacterianas (nas quais a concentração de sais era menor) para o meio de cultura (hipertônico), causando a retração do volume celular (O'BYRNE; BOOTH, 2002). Observa-se pela Figura 34 que as colônias de *S. aureus* também sofreram redução em seu tamanho.

Figura 33 – Ensaio biológico de tolerância à sal de *E. coli*.



Legenda: Colônias de *E. coli*: A: NaCl 0%; B: NaCl 2,5%; Tratamento com carvacrol: C: NaCl 0%; D: NaCl 2,5%; Tratamento com eugenol: E: NaCl 0%; F: NaCl 2,5%; Tratamento com *trans*-cinamaldeído: G: NaCl 0%; H: NaCl 2,5%; Tratamento com carvona: I: NaCl 0%; J: NaCl 2,5%. Desenvolvimento após 24 horas de tratamento e incubação à 37 °C. Fonte: Do autor (2019).

Figura 34 – Ensaio biológico de tolerância à sal de *S. aureus*.



Legenda: Colônias de *S. aureus*: A: NaCl 0%; B: NaCl 2,5%; C: 5%; Tratamento com β -citronelol: D: NaCl 0%; E: NaCl 2,5%; F: NaCl 5%; Tratamento com carvacrol: G: NaCl 0%; H: NaCl 2,5%; I: NaCl 5%; Tratamento com eugenol: J: NaCl 0%; L: NaCl 2,5%; M: NaCl 5%; Tratamento com *trans*-cinamaldeído: N: NaCl 0%; O: NaCl 2,5%; P: NaCl 5%; Tratamento com carvona: Q: NaCl 0%; R: NaCl 2,5%; S: NaCl 5%. Desenvolvimento após 24 horas de tratamento e incubação à 37 °C. Fonte: Do autor (2019).

Na Figura 34 (A), está registrado o crescimento de *Staphylococcus aureus* sem tratamento (microrganismo-controle) inoculado em ágar Mueller-Hinton puro, que pode ser considerado como desenvolvimento normal para a bactéria nesse meio de cultura. Nota-se a presença de colônias ligeiramente menores no controle plaqueado em meio saturado com 2,5 e 5% de sal, provavelmente pelo mesmo fato explicado anteriormente para *E. coli*. Em relação ao plaqueamento de *S. aureus* tratada com os padrões (FIGURA 34 D-S), verifica-se o surgimento de colônias pequenas, independentemente da concentração de sal do meio.

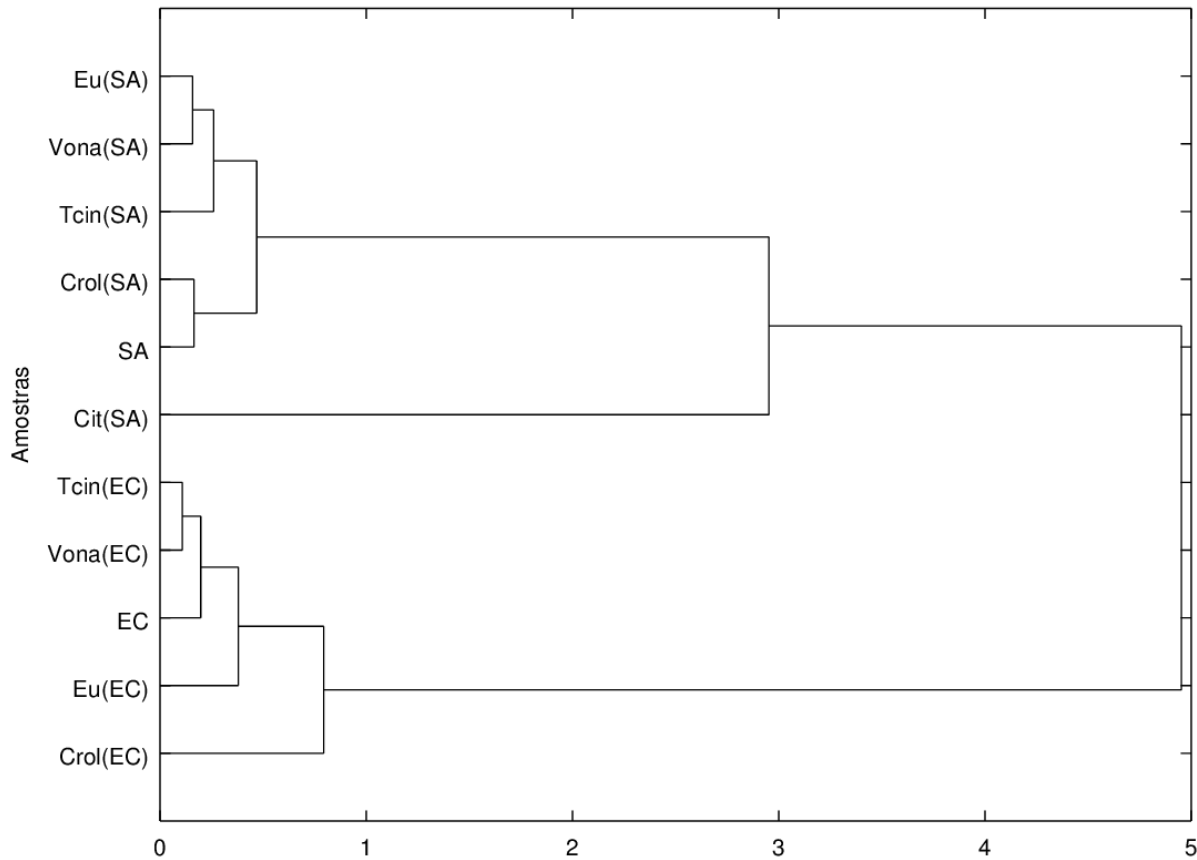
De acordo com O'Byrne e Booth (2002), o desenvolvimento bacteriano exige uma pressão de turgescência dirigida para o interior da célula, ou seja, para que ocorra o crescimento e a multiplicação, é necessário que haja a entrada de água na célula. Essa constatação, permite supor que os padrões podem exercer um efeito negativo na regulação do fluxo de água, diminuindo sua entrada na célula.

Uma análise mais detalhada permite identificar padrões na ação dos compostos testados (carvona, β -citronelol, carvacrol, eugenol e *trans*-cinamaldeído) e agrupá-los de acordo com as implicações na capacidade de tolerância a sal dos microrganismos em estudo. Na Figura 35, está representado um dendrograma para similaridade entre os tratamentos. As amostras de tratamentos conectados entre si causam efeitos semelhantes na tolerância a sal das cepas bacterianas. Essa semelhança diminui conforme aumenta a distância de conectividade (eixo x) entre os tratamentos (eixo y).

Para *S. aureus*, percebe-se que os tratamentos com eugenol, carvona e *trans*-cinamaldeído induziram respostas similares na osmorregulação. O carvacrol, por sua vez, parece não ter influência sobre o desenvolvimento do microrganismo em diferentes teores de salinidade, pois seu comportamento foi semelhante ao controle. Pelo dendrograma, pode-se concluir ainda que o composto β -citronelol atuou de forma completamente diferente dos demais padrões, apresentando melhor atividade nos ensaios biológicos em questão.

Em relação à *E. coli*, os testes com carvona e *trans*-cinamaldeído parecem não afetar o desenvolvimento das células em meios saturados, pois causaram crescimento análogo às colônias-controle. As respostas similares desses compostos podem estar relacionadas à presença do grupo carbonila e à reatividade das funções cetona e aldeído, relativamente parecidas. O tratamento da cepa bacteriana com os constituintes carvacrol e eugenol diferiram do controle, evidenciando a possível ação desses padrões em mecanismos relacionados à manutenção da pressão osmótica.

Figura 35 – Dendrograma de similaridade entre os tratamentos pelo teste de tolerância a sal.



Legenda: Eu(SA): *S. aureus* tratada com eugenol; Vona(SA): *S. aureus* tratada com carvona; Tcin(SA): *S. aureus* tratada com *trans*-cinamaldeído; Crol(SA): *S. aureus* tratada com carvacrol; Cit(SA): *S. aureus* tratada com β -citronelol; SA: *S. aureus*; Tcin(EC): *E. coli* tratada com *trans*-cinamaldeído; Vona(EC): *E. coli* tratada com carvona; Eu(EC): *E. coli* tratada com eugenol; Crol(EC): *E. coli* tratada com carvacrol; EC: *E. coli*. Todos os tratamentos foram realizados na concentração $\frac{1}{2}$ CMI. Coordenada x: Índice de similaridade entre as amostras (quanto menor a distância de conectividade entre os tratamentos, maior a similaridade). Fonte: Do autor (2019).

4.4 Avaliação da influência dos padrões na liberação de constituintes celulares em *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

Muitos terpenos e fenilpropanoides induzem modificações nas membranas celulares, pois são capazes de interagir com sua porção lipídica, causando alterações na funcionalidade, integridade da membrana e, em alguns casos, levando ao rompimento da estrutura. Uma vez que o composto apresenta essa atividade, pode ocorrer o efluxo celular de moléculas, como aminoácidos, proteínas ou ácidos nucleicos, que são detectadas por espectrofotometria na faixa do ultravioleta (260 nm) (SHEN et al., 2015).

Macromoléculas podem ser liberados pelas células em situações nas quais a estrutura da membrana plasmática esteja comprometida; logo, informações sobre o extravasamento celular fornecem dados para avaliação da integridade da parede bacteriana.

Para estimar a liberação de constituintes celulares, foram realizadas leituras de absorvância do meio. Um aumento na absorvância implica o aumento da perda de conteúdos absorventes pelos microrganismos, indicando danos à membrana. Todavia, os grupos funcionais presentes nos terpenos e fenilpropanoides, em especial carbonilas e hidroxilas, causam interferência na análise, resultando em incremento dos valores de absorvância.

Os resultados para os ensaios de liberação de constituintes celulares por *E. coli* e *S. aureus*, após o tratamento com os terpenos e fenilpropanoides em estudo, estão representados nos gráficos das Figuras 36 a 46.

Esperar-se-ia um comportamento linear e crescente para liberação de constituintes celulares bacterianos (como descrito nos trabalhos de Devi et al. (2010); Shen et al. (2015) e Xu et al. (2016), por exemplo), no entanto, observa-se a presença de picos de máximo e mínimo. Algumas inferências podem ser feitas a respeito desses resultados. A existência de picos de máximo pode estar relacionada à efusão de constituintes ocasionada por alterações na membrana celular.

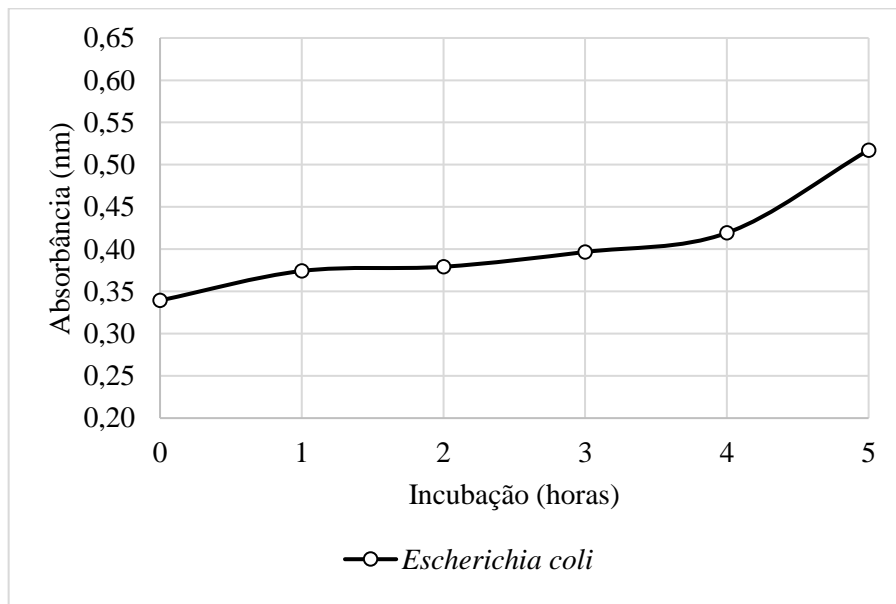
Uma vez que os ensaios foram conduzidos em meio de cultura, a presença de nutrientes fornece condições mínimas para proliferação bacteriana. Assim, o decréscimo na absorvância pode indicar que as moléculas liberadas, após o rompimento celular (tais como peptídeos, proteínas, enzimas, etc), foram incorporadas pelos microrganismos sobreviventes para seu próprio metabolismo.

Os constituintes celulares absorventes em 260 nm são macromoléculas que apresentam variados grupos funcionais. Os ácidos nucleicos, por exemplo, são bases nitrogenadas, com presença de insaturações, grupamentos amino e carboxilas. Quando em contato com os padrões presentes no tratamento, podem ocorrer reações de adição, substituição, lise da cadeia, dentre outras. Os produtos formados nessas reações podem apresentar picos de absorvância em faixas de energia diferentes da analisada, causando, assim, o comportamento senoidal observado nas curvas.

Além disso, caso os padrões apresentem a capacidade de atravessar a membrana bacteriana e penetrar no interior da célula, pode ocorrer diminuição nos valores de absorvância. Como já dito, terpenos e fenilpropanoides também apresentam picos de absorção na faixa de 260 nm. Sua mobilidade para o interior da célula implica a indisponibilidade desses compostos em solução, podendo, assim, reduzir a absorvância nas leituras da amostra.

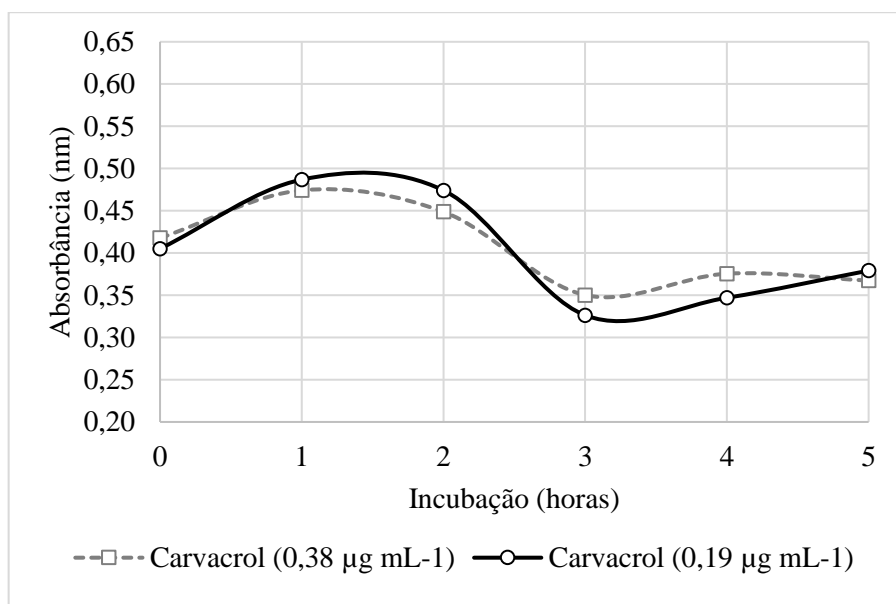
Para os tratamentos de *E. coli* (FIGURA 37 a 40), *trans*-cinamaldeído foi o composto que apresentou maior pico de liberação de constituintes celulares, seguido da carvona. Os compostos fenólicos estudados causaram efluxo de moléculas entre 1 e 2 horas de incubação. Aparentemente, o mecanismo de ação do carvacrol, *trans*-cinamaldeído e eugenol em *E. coli* podem ser semelhantes, avaliando seus perfis de extravasamento moleculares.

Figura 36 – Liberação de constituintes celulares de *E. coli*.



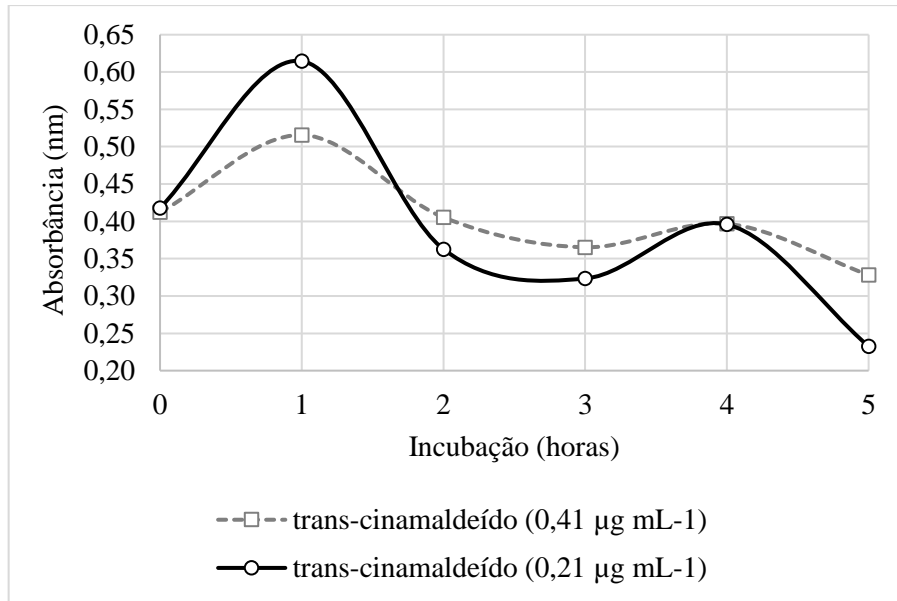
Fonte: Do autor (2019).

Figura 37 – Liberação de constituintes celulares de *E. coli* induzida por carvacrol.



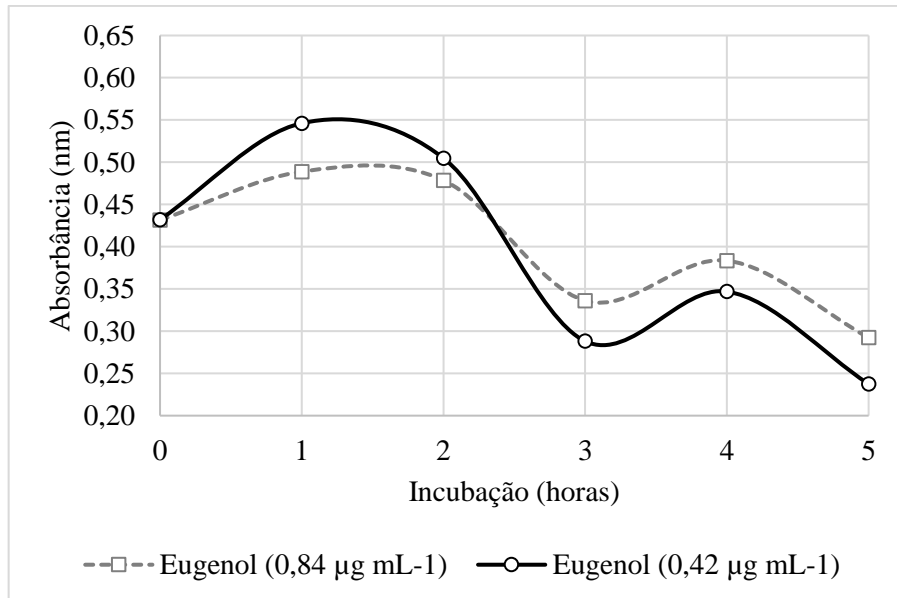
Fonte: Do autor (2019).

Figura 38 – Liberação de constituintes celulares de *E. coli* induzida por *trans*-cinamaldeído.



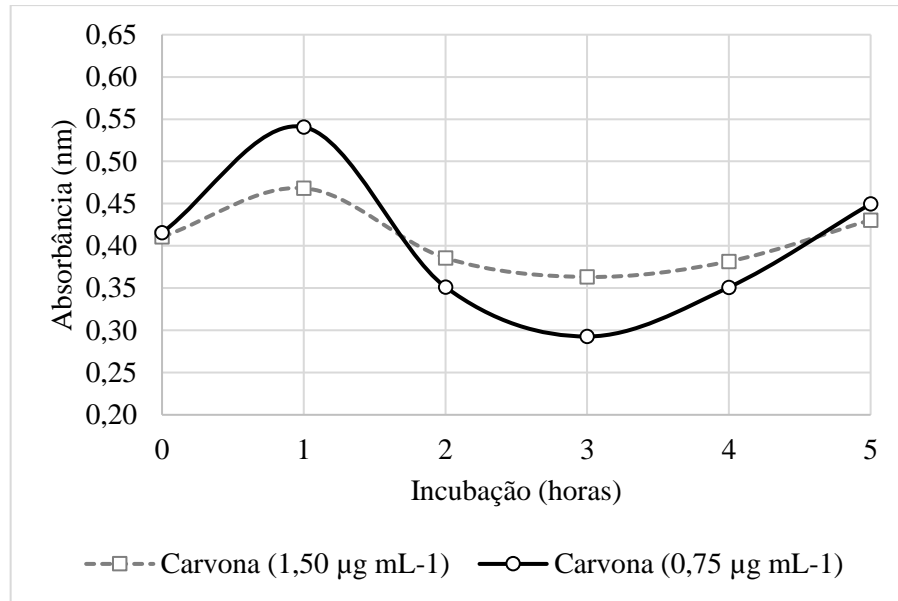
Fonte: Do autor (2019).

Figura 39 – Liberação de constituintes celulares de *E. coli* induzida por eugenol.



Fonte: Do autor (2019).

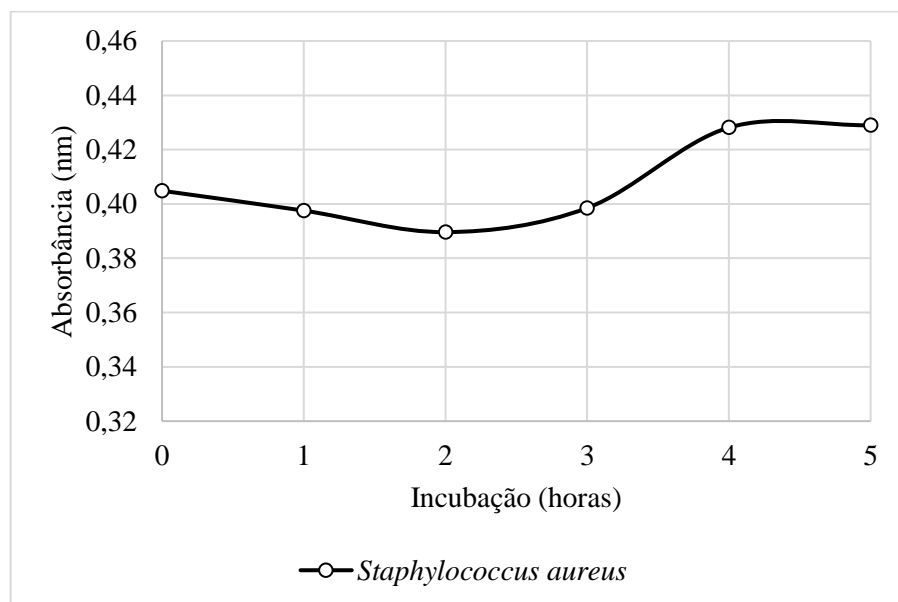
Figura 40 – Liberação de constituintes celulares de *E. coli* induzida por carvona.



Fonte: Do autor (2019).

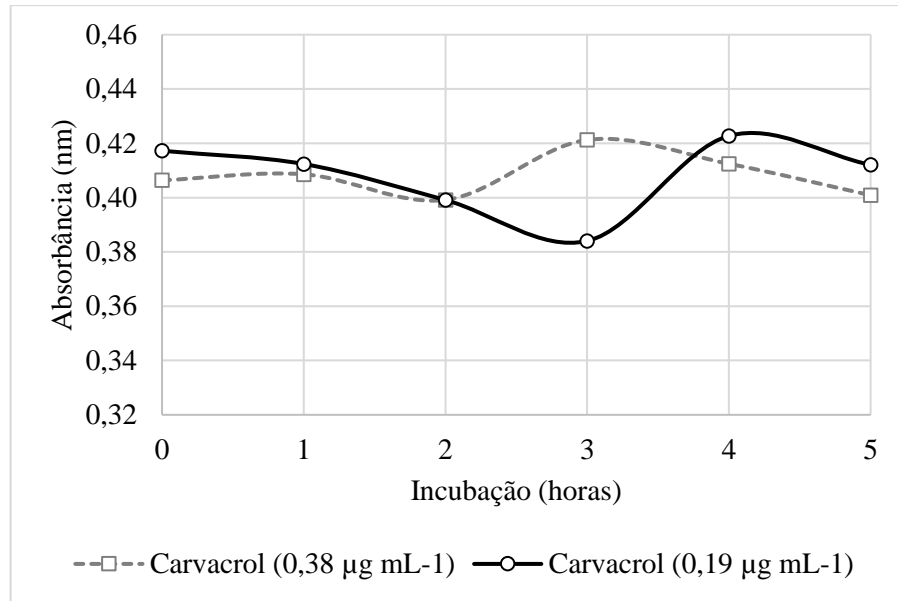
O efeito das amostras sobre *S. aureus* (FIGURA 42 a 46) difere completamente do comportamento observado em *E. coli*. Na presença do carvacrol e do *trans*-cinamaldeído, observa-se tendência ao aumento na liberação de constituintes a partir de 3 horas de incubação, causando efusão máxima com 4 horas de tratamento. Em relação à carvona e β -citronelol, uma variação muito pequena é observada no decorrer do ensaio biológico. Com o álcool terpenico, pode se considerar a ausência de efluxo de materiais celulares.

Figura 41 – Liberação de constituintes celulares de *S. aureus*.



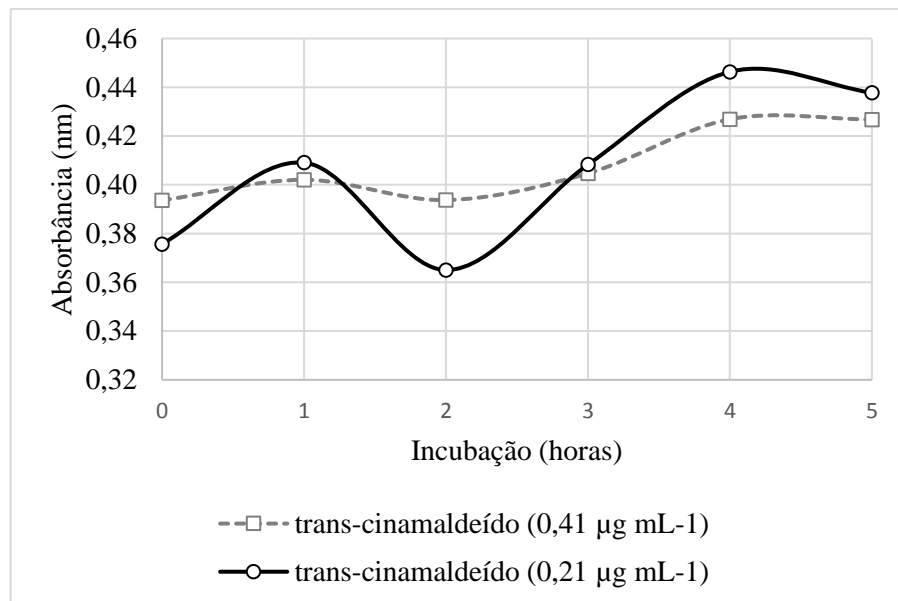
Fonte: Do autor (2019).

Figura 42 – Liberação de constituintes celulares de *S. aureus* induzida por carvacrol.



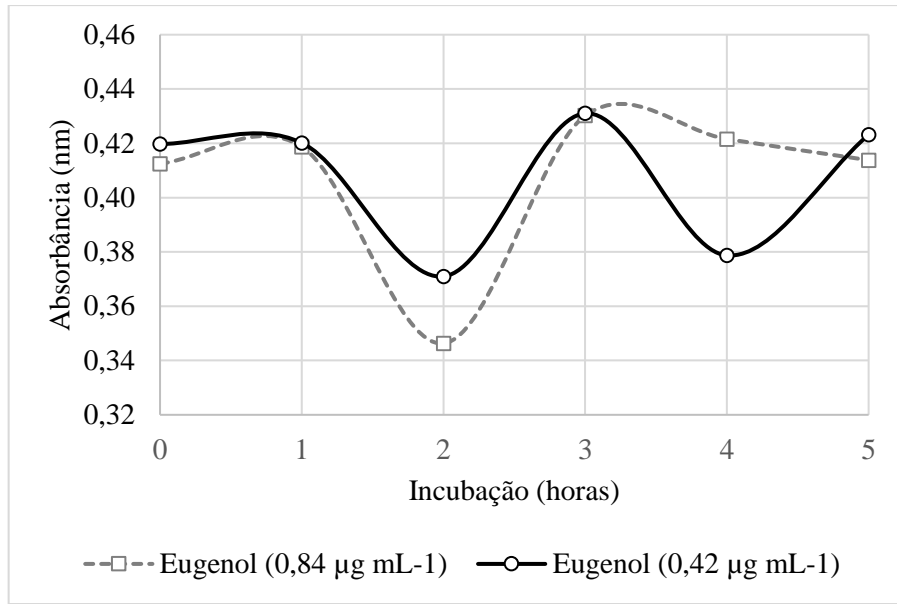
Fonte: Do autor (2019).

Figura 43 – Liberação de constituintes celulares de *S. aureus* induzida por *trans*-cinamaldeído.



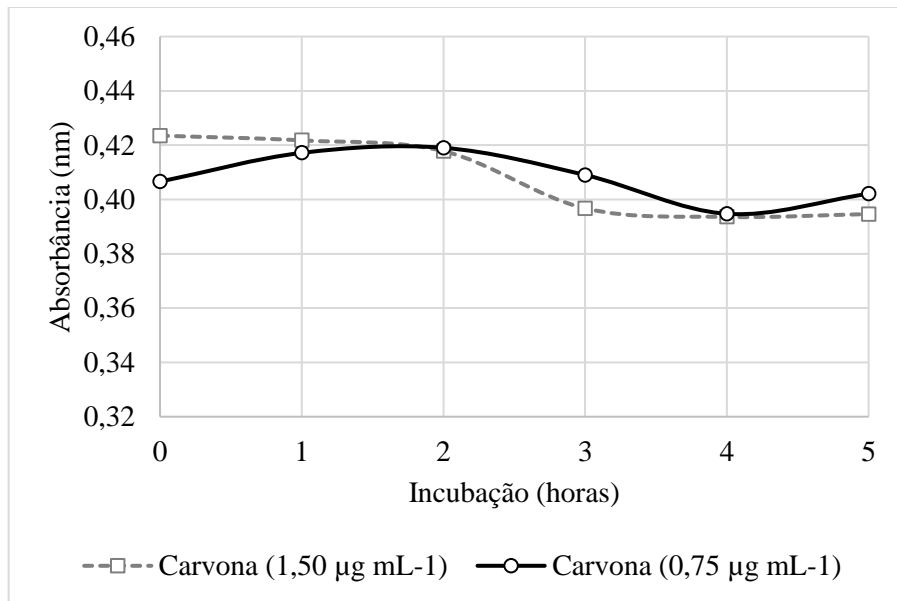
Fonte: Do autor (2019).

Figura 44 – Liberação de constituintes celulares de *S. aureus* induzida por eugenol.



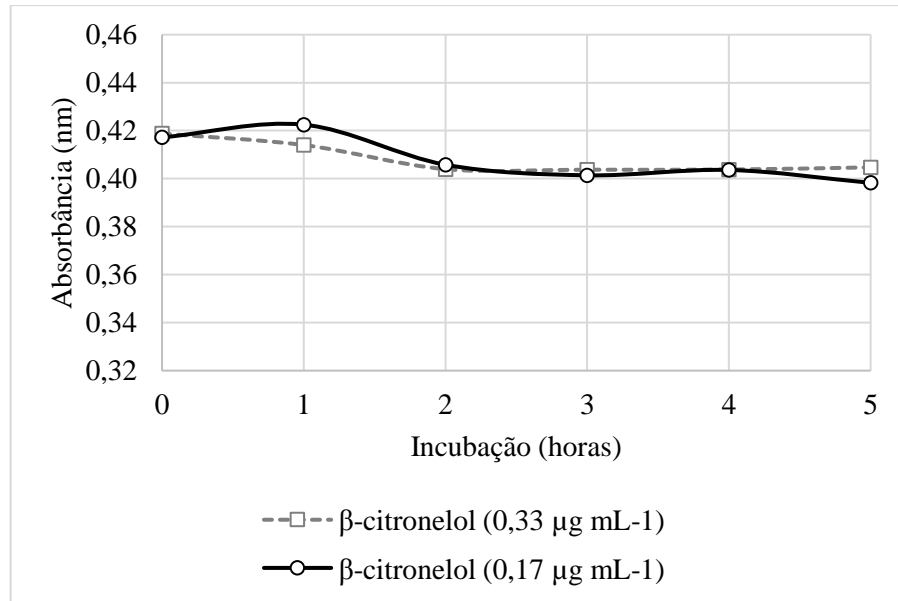
Fonte: Do autor (2019).

Figura 45 – Liberação de constituintes celulares de *S. aureus* induzida por carvona



Fonte: Do autor (2019).

Figura 46 – Liberação de constituintes celulares de *S. aureus* induzida por β -citronelol.



Fonte: Do autor (2019).

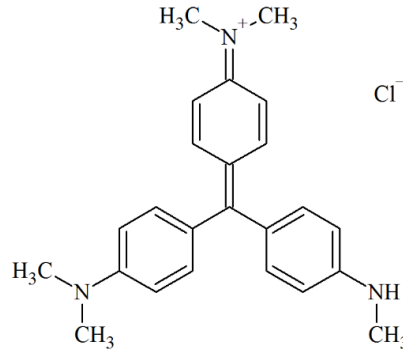
Os controles bacterianos (FIGURA 36 e 41), por sua vez, sofreram aumento no extravasamento celular a partir de 3 horas de incubação. Esse fato pode ser atribuído à morte natural do microrganismo. Outro motivo possível para o aumento das leituras de absorvância pode estar relacionado à produção e liberação de moléculas sinalizadoras, denominadas *quórum*. Durante seu desenvolvimento, as bactérias liberam sinalizadores químicos capazes de estabelecer um sistema de comunicação conhecido como *Quórum sensing*. Nesse sistema, moléculas são excretadas para o meio externo, e se acumulam no ambiente. Dentre os diferentes sinalizadores, estão derivados de ácidos graxos com estrutura de lactonas, aminoácidos e pequenos peptídeos, que são capazes de absorver energia na faixa de comprimento de onda empregado (SOLA et al, 2012).

4.5 Avaliação da influência dos padrões na permeabilidade da membrana celular de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

O cristal violeta (cloreto de hexametilpararosnilina; FIGURA 47) é uma tintura que se adsorve nas células bacterianas, sendo facilmente fixada em espécies Gram-positivas, devido à espessa parede de peptidoglicano que reveste a membrana citoplasmática. No entanto, esse corante também pode ser absorvido por bactérias Gram-negativas em menor proporção (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Tendo como base esse princípio, a quantidade de cristal violeta absorvido pode ser um indicativo da integridade estrutural da parede celular. Assim,

objetivou-se neste ensaio estimar os danos à permeabilidade da membrana, correlacionando-os às diferenças percentuais de cristal violeta livre ou absorvido afetados pelos tratamentos com os padrões.

Figura 47 – Estrutura química do cristal violeta.



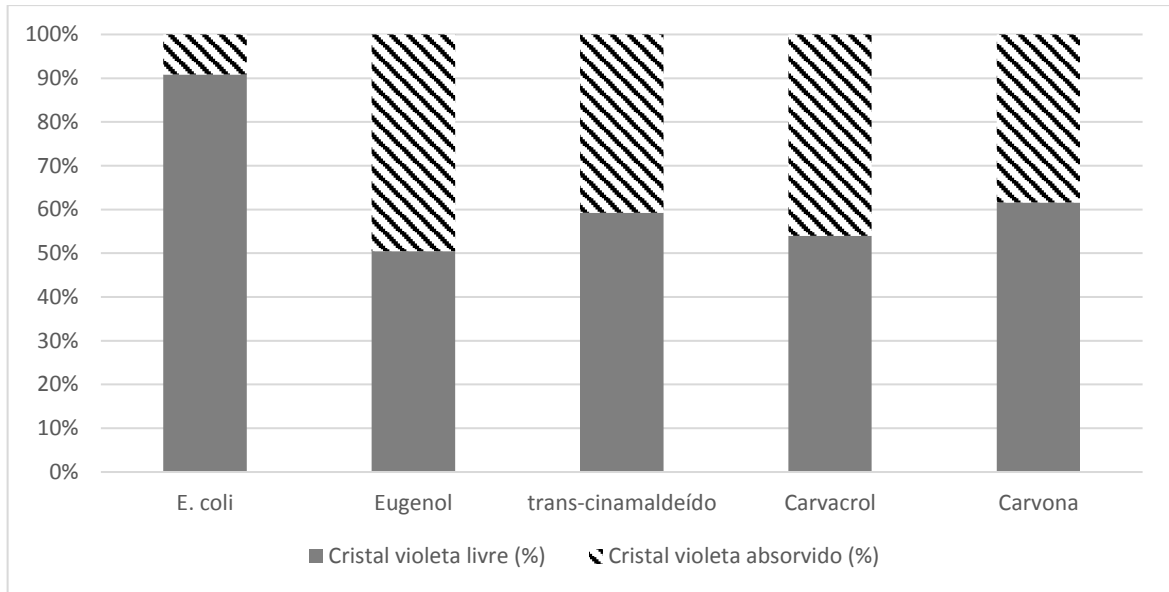
Fonte: Do autor (2019).

Na Tabela 9, estão descritos os valores para teor de cristal violeta livre e absorvido determinados pelo teste. Esses dados foram esquematizados em gráficos de coluna empilhada contidos nas Figuras 48 e 49.

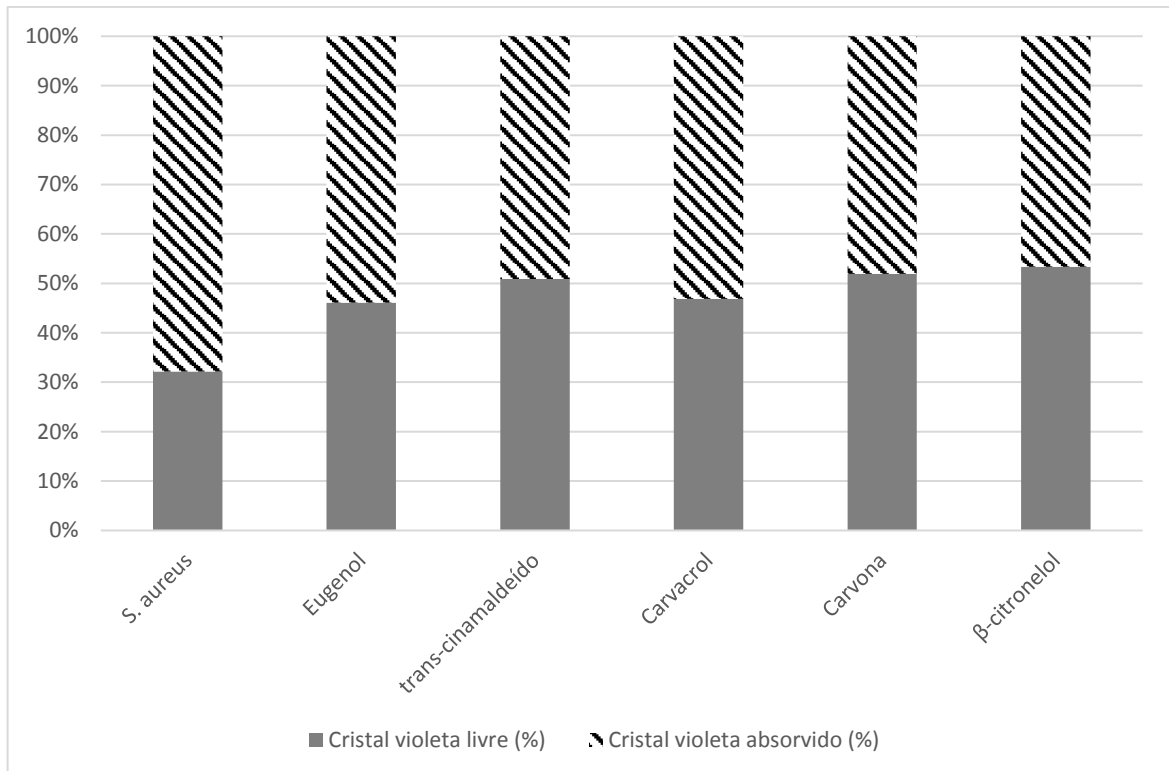
Tabela 9 – Ensaio de absorção de cristal violeta.

Bactéria	Tratamento	Cristal violeta	
		% livre	% absorvida
<i>E. coli</i>	Controle positivo	90,87 ± 4,99 eA	9,13 aB
	Eugenol	50,48 ± 1,37 cA	49,52 cA
	<i>trans</i> -cinamaldeído	59,25 ± 2,19 dB	40,75 bA
	Carvacrol	53,99 ± 0,53 cB	46,01 cA
	Carvona	61,56 ± 0,96 dB	38,44 bA
<i>S. aureus</i>	Controle positivo	32,15 ± 6,58 aA	67,85 eB
	Eugenol	46,11 ± 2,36 bA	53,89 dB
	<i>trans</i> -cinamaldeído	50,87 ± 2,77 cA	49,13 cA
	Carvacrol	46,86 ± 1,57 bA	53,14 dB
	Carvona	51,91 ± 1,29 cA	48,09 cA
	B-citronelol	53,32 ± 3,09 cB	46,68 cA

Legenda: Letras **minúsculas** iguais na **coluna** não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância; letras **maiúsculas** iguais na **linha** não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância. Fonte: Do autor (2019).

Figura 48 – Ensaio de absorção de cristal violeta por *E. coli*.

Fonte: Do autor (2019).

Figura 49 – Ensaio de absorção de cristal violeta por *S. aureus*.

Fonte: Do autor (2019).

É possível observar que houve diferença significativa entre a absorção de cristal violeta pelas células-controles e pelas células tratadas. Como era esperado, *S. aureus* foi capaz de reter maior quantidade de cristal violeta (67,85%), comparado à *E. coli* (9,13%), devido à espessa

parede de peptidoglicano. Provavelmente, a baixa absorção de corante pelas células-controle de *E. coli* está relacionada à presença da membrana externa, que constitui uma barreira extra à entrada de agentes indesejáveis no microrganismo.

As células Gram-negativas tratadas com os padrões apresentaram aumento substancial na absorção de cristal violeta, quando equiparadas ao controle positivo. Esses resultados são fortes indicativos de que os terpenos e fenilpropanoides empregados alteram a permeabilidade da membrana; no entanto, não são capazes de romper a estrutura celular; caso contrário, não seria observada redução no teor de corante livre. Supõe-se que essa alteração seja suficiente para permitir que moléculas relativamente grandes, como o cristal violeta, penetrem facilmente na célula.

Para *S. aureus*, observou-se redução no teor de cristal violeta absorvido pelas células tratadas comparadas ao controle positivo. Assim como para *E. coli*, pode-se inferir que os padrões causaram efeitos negativos na integridade da membrana e da parede celular bacteriana. Nesse caso, não é possível distinguir se a redução na absorção ocorreu devido a modificações na estrutura da membrana ou ao rompimento da estrutura celular. Contudo, pode-se perceber que a capacidade de reter o corante no interior das células demonstrada no tratamento-controle foi perdida com a adição dos padrões.

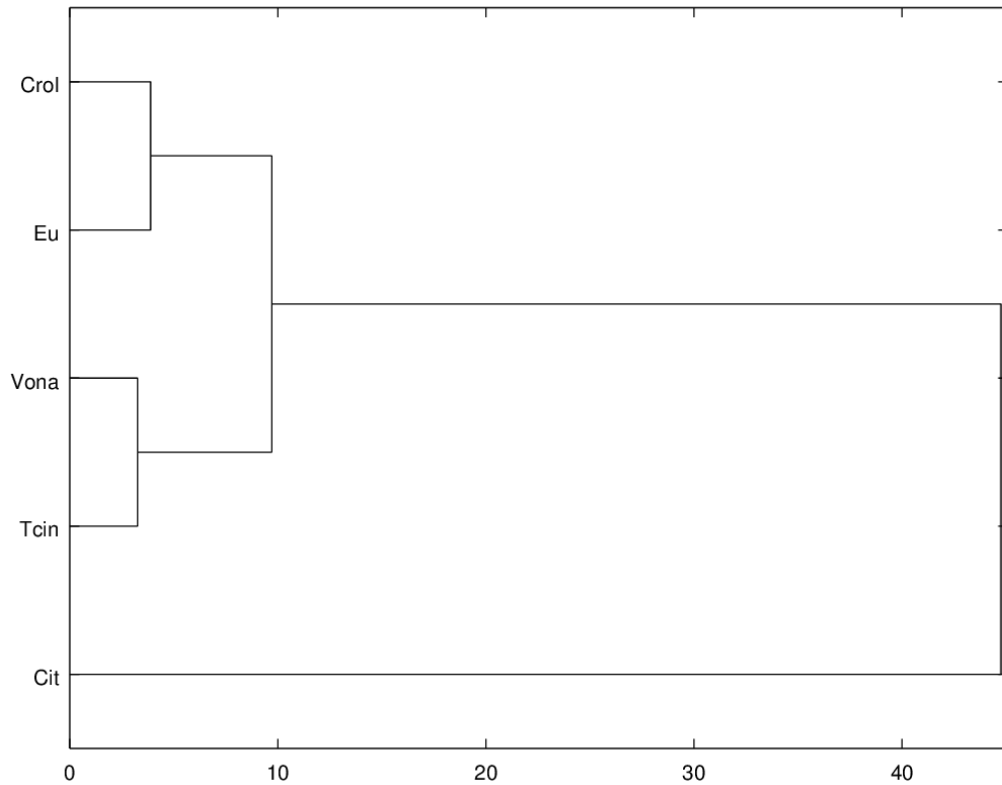
Analisando as respostas induzidas pelos padrões nas bactérias, observa-se similaridade entre os efeitos causados pelos pares eugenol e carvacrol; *trans*-cinamaldeído e carvona. Com isso, pode-se inferir que compostos fenólicos causam alterações que culminam em respostas diferentes de compostos com grupos carbonila, e compostos cetônicos e aldólicos podem apresentar respostas similares. Em relação ao padrão β -citronelol (álcool alifático), observa-se que sua atividade sobre *S. aureus* também diminuiu a capacidade de retenção do corante de modo análogo à carvona e *trans*-cinamaldeído.

Pode-se ainda notar que os padrões eugenol e carvacrol ocasionaram maiores absorções de cristal violeta para *E. coli*, ao passo que *trans*-cinamaldeído, carvona e β -citronelol foram responsáveis pela maior redução na absorção deste por *S. aureus*, ou seja, os compostos fenólicos foram mais tóxicos para *E. coli*, e os demais compostos, para *S. aureus*.

De modo geral, esses resultados permitem notar que o mecanismo de atuação dos padrões empregados envolve aumento na permeabilidade da membrana para ambos os microrganismos, mas parece não causar rompimento da estrutura de *E. coli* e não permite distinguir se houve rompimento celular em *S. aureus*.

O padrão de comportamento das amostras pôde ser analisado relacionando os resultados obtidos em todos os ensaios biológicos realizados. Na figura a seguir, estão representados os resultados para o Agrupamento Hierárquico dos padrões testados.

Figura 50 – Dendrograma para avaliação geral do comportamento das amostras.



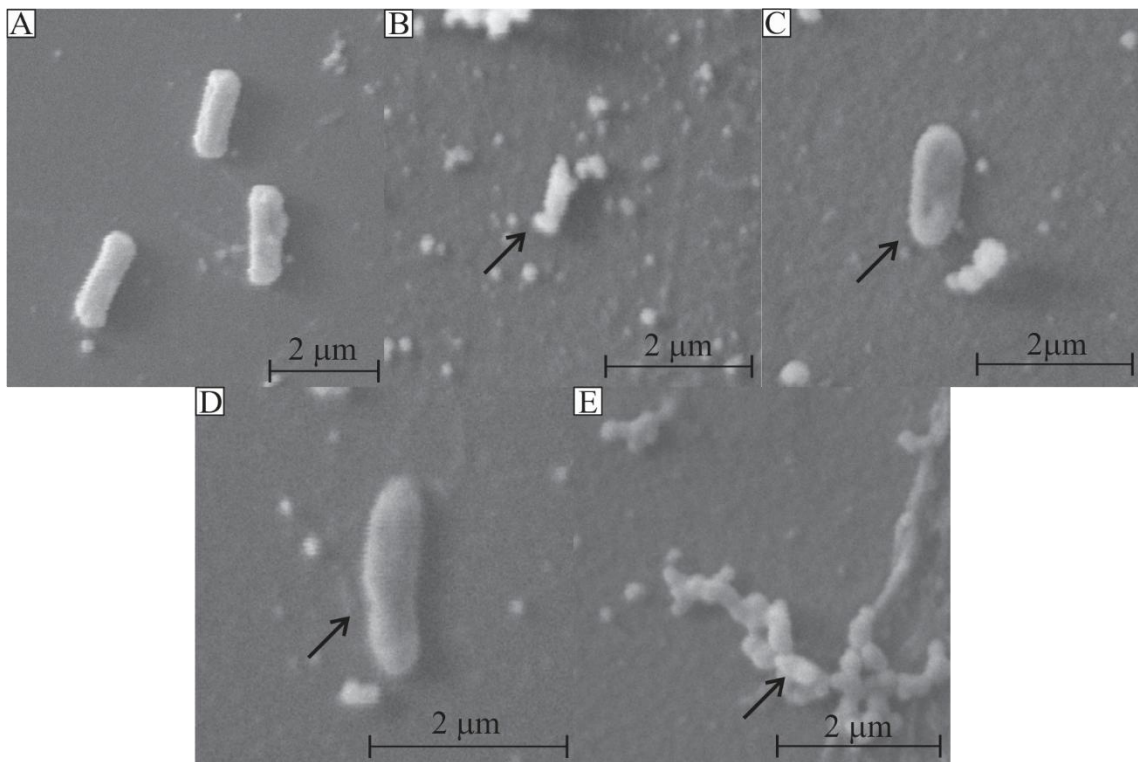
Legenda: Eu: eugenol; Crol: carvacrol; Tcin: *trans*-cinamaldeído; Vona: carvona; Cit: β -citronelol. Coordenada x: Índice de similaridade entre as amostras (quanto menor a distância de conectividade entre as amostras, maior a similaridade). Fonte: Do autor (2019).

Pelo dendrograma, pode-se identificar maior proximidade na resposta induzida por tratamentos com eugenol e carvacrol. Os padrões *trans*-cinamaldeído e carvona também parecem exibir comportamentos antibacterianos similares. Essas quatro amostras podem ser descritas por possuírem atuação semelhante entre si e diferente de β -citronelol, resultados já esperados, pois o composto β -citronelol não apresentou atividade antibacteriana sobre *E. coli*. Essas conclusões corroboram com o observado nos testes anteriormente.

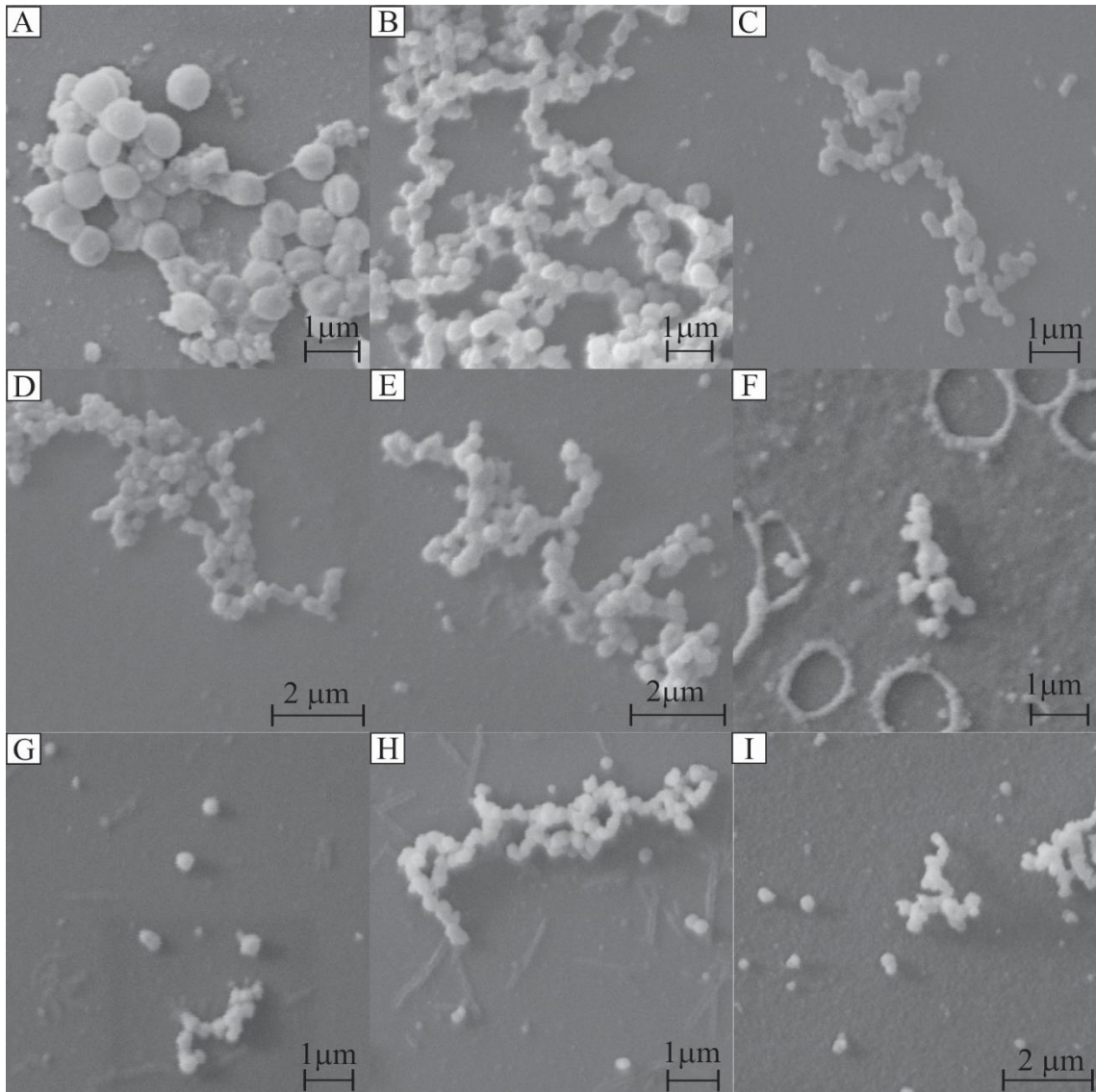
4.6 Avaliação das alterações morfológicas induzidas pelos padrões em *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

As eletromicrografias obtidas em microscópio eletrônico de varredura são apresentadas nas Figuras 51 e 52. Pelas imagens, nota-se influência dos padrões nos tamanhos e morfologia das bactérias. Para *E. coli*, observa-se inchaço das células causado pelos tratamentos com *trans*-cinamaldeído e carvacrol (Figura 51 C e D), e alterações morfológicas causadas pelos tratamentos com eugenol e carvona (Figura 51 B e E). Já *S. aureus* sofreu redução no volume celular ocasionado por todos os tratamentos (Figura 52 B-I).

Figura 51 – Eletromicrografias de *E. coli*.



Legenda: A: *E. coli* sem tratamento; B: *E. coli* tratada com eugenol; C: *E. coli* tratada com *trans*-cinamaldeído; D: *E. coli* tratada com carvacrol; E: *E. coli* tratada com carvona. Imagens obtidas após 24 horas de tratamento e incubação a 37 °C. As setas indicam possíveis células bacterianas com alterações morfológicas. Fonte: Do autor (2019).

Figura 52 – Eletromicrografias de *S. aureus*.

Legenda: A: *S. aureus* sem tratamento; B: *S. aureus* tratada com carvacrol; C: *S. aureus* tratada com β -citronelol; D: *S. aureus* tratada com carvona; E: *S. aureus* tratada com limoneno; F: *S. aureus* tratada com eugenol (CMB); G: *S. aureus* tratada com eugenol (CMI); H: *S. aureus* tratada com *trans*-cinamaldeído (CMB); I: *S. aureus* tratada com *trans*-cinamaldeído (CMI). Imagens obtidas após 24 horas de tratamento e incubação a 37 °C. Fonte: Do autor (2019).

As imagens obtidas por MEV complementam os resultados observados nos ensaios discutidos anteriormente. Os compostos testados parecem ter atividade sobre a funcionalidade da membrana, seja alterando a capacidade osmorregulatória dos microrganismos (como pode-se supor pelos testes de tolerância a sal), seja afetando a integridade e permeabilidade da membrana (conclusões obtidas pelos testes de liberação de constituintes absorventes e absorção de cristais violeta); no entanto, não causam lise celular.

S. aureus é uma bactéria Gram-positiva que apresenta a forma de cocos (Figura 54 A). Sua forma e o arranjo assumido pelas moléculas parece não terem sido afetados pelos

tratamentos com os padrões. Já *E. coli*, que é uma bactéria Gram-negativa em forma de bacilo (como pode ser verificado na Figura 53 A), teve sua estrutura morfológica alterada quando exposta aos padrões testados. Essas diferenças na sensibilidade dos microrganismos podem ser devido à camada de peptidoglicano que reveste as células. De acordo com Tortora, Funke e Case (2012), uma das funções da parede celular é manter a forma e impedir a ruptura das células bacterianas. Sabe-se que a parede celular de espécies Gram-positivas é composta exclusivamente por peptidoglicano, o que a torna espessa e rígida. Microrganismos Gram-negativos, no entanto, apresentam poucas camadas de peptidoglicano e uma membrana externa constituída de lipopolissacarídeos, lipoproteínas e fosfolipídeos. Essa membrana adicional confere resistência a determinados antibióticos; no entanto, não apresenta a mesma rigidez que a camada peptídica. Logo, pode-se supor que a atuação dos padrões em *E. coli* envolve mecanismos intracelulares que afetam a síntese da parede celular, causando alterações morfológicas.

Romero et al. (2015) demonstraram que a melhor atividade antibacteriana do composto β -citronelol, comparado ao seu análogo β -citronelal, pode estar relacionada à presença do grupo hidroxila. Essa constatação permite entender a maior atividade desse composto sobre *S. aureus* em relação ao monoterpeno carvona, observada no presente trabalho. De acordo com os autores, houve aumento da hidrofobicidade da superfície celular, alteração na tensão superficial das células, danos e permeabilização da membrana celular de *E. coli* causados pelo composto carvona, e as mesmas decorrências à *E. coli* e *S. aureus* causados por β -citronelol. Outro efeito relatado foi a alteração na carga superficial das células bacterianas. Em condições fisiológicas, as bactérias possuem carga superficial negativa devido à presença de grupos aniônicos. O tratamento das células Gram-negativas (com β -citronelol e carvona) e Gram-positivas (β -citronelol) causou redução (valores menos negativos) da carga superficial. Os pesquisadores observaram ainda liberação de íons potássio apenas em células de *S. aureus*. O fato de *E. coli* sofrer danos na permeabilidade da membrana e não apresentar extravasamento de íons foi atribuído à retenção dos íons potássio na parede celular de *E. coli*. Essas suposições também podem explicar a ausência de efluxo de potássio observada neste estudo para todos compostos testados. Uma vez que as células claramente sofreram alteração em sua permeabilidade após o tratamento (evidenciado pelo teste de cristal violeta), era de se esperar extravasamento de íons K^+ ; porém, se esses íons ficam retidos na parede celular, os valores para concentração de potássio no meio permanecem constantes, como foi verificado.

Rhayour et al. (2003) estudaram os mecanismos antibacterianos do carvacrol em *E. coli* e *Bacillus subtilis*, baseando-se em alterações na membrana celular. Os autores observaram um

efeito dose-dependente na liberação de constituintes celulares pelos microrganismos e aumento linear dessa liberação com aumento do tempo de incubação. Danos ao envelope bacteriano de *E. coli* e deformidade celular em *B. subtilis* (Gram-positivo) foram constatados por eletromicrografias obtidas em MEV e corroboram com os resultados deste trabalho. Nota-se alterações maiores na estrutura celular de *E. coli*, ao passo que para *S. aureus*, houve modificação no tamanho celular. Ultee, Kets e Smid (1999) avaliaram a ação do carvacrol em *B. cereus* e comprovaram que esse composto é capaz de afetar os pools de ATP intracelulares, causar redução no potencial de membrana, no pH e na concentração de K^+ intracelular. Alterações nos níveis extracelulares de ATP não ocorreram com os tratamentos, indicando que o carvacrol pode atuar na redução da síntese de ATP.

O eugenol também é capaz de causar danos às membranas bacterianas. Devi et al. (2010) constataram extravasamento de conteúdos intracelulares absorventes em 260 nm, liberação de proteínas e aumento na absorção de cristal violeta por células de *Salmonella typhi* (Gram-negativa) tratadas com o composto. Modificações e perda da integridade da membrana observadas por microscopia eletrônica de varredura foram atribuídas experimentalmente a alterações nos grupos funcionais de ésteres de lipídios, ácidos graxos, proteínas, ácidos nucleicos, polissacarídeos do envelope e deformações nos fosfolipídeos da membrana. Corroborando com os resultados de Devi et al. (2010), foram observadas alterações significativas na absorção de cristal violeta e na morfologia de *E. coli*, ocasionadas pelo tratamento com eugenol.

Nowotarska et al. (2017) elucidam possíveis mecanismos de ação do *trans*-cinamaldeído. Os pesquisadores demonstraram que esse fenilpropanoide causa aumento nos níveis de fosfato extracelular e redução da concentração de ATP intracelular do microrganismo *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, sugerindo alterações na permeabilidade da membrana. Para avaliar os efeitos na liberação de constituintes celulares, leituras de absorbância também foram realizadas na faixa de 230 a 370 nm. Os autores constataram que a absorbância dos tratamentos era inferior à absorbância do composto puro, já no tempo inicial. Nowotarska et al. (2017) relacionaram esse fato à adsorção das moléculas de *trans*-cinamaldeído à superfície celular ou captação dessas moléculas pelas células bacterianas. Novos picos identificados na varredura foram atribuídos à liberação de conteúdos celulares, como ácidos nucleicos, ou alterações no próprio *trans*-cinamaldeído causadas pelo metabolismo bacteriano. Essas conclusões corroboram e explicam as observações realizadas neste estudo, em que foram obtidas curvas para liberação de constituintes celulares com

comportamento distinto de outras pesquisas já citadas anteriormente (por exemplo, Devi et al., 2010; Rhayour et al., 2003; Shen et al., 2015, Xu et al., 2016).

Dados dos trabalhos de Shen et al. (2015) corroboram com a afirmativa de que o composto *trans*-cinamaldeído causa extravasamento de materiais e íons intracelulares e imagens obtidas por MEV e por MET demonstram os danos externos e internos causados à estrutura de *E. coli* e *S. aureus*. Os autores justificaram as modificações externas nas células pela penetração do *trans*-cinamaldeído no envelope bacteriano, alterando sua estrutura. Dentre os danos internos, foi relatada separação da membrana citoplasmática da parede celular e danos na parede celular. No presente estudo, não foram realizadas análises das células bacterianas tratadas por microscopia de transmissão; no entanto, pode-se associar as observações de Shen et al. (2015) às alterações na permeabilidade da membrana de *S. aureus* e *E. coli* avaliadas pela absorção de cristal violeta.

5 CONCLUSÕES

Os compostos carvona, carvacrol, eugenol e *trans*-cinamaldeído apresentaram potencial bacteriostático e bactericida sobre as cepas de *E. coli* e *S. aureus*, em concentrações que variaram de 0,39 a 1,56 $\mu\text{L mL}^{-1}$.

Os padrões β -citronelol e limoneno apresentaram atividade apenas sobre *S. aureus*, com as CMIs e CMBs de 0,39 e 25 $\mu\text{L mL}^{-1}$, respectivamente.

Os terpenos e fenilpropanoides avaliados foram capazes de provocar danos à membrana bacteriana, possivelmente alterando sua permeabilidade, como comprovado nos testes de tolerância a sal, liberação de constituintes celulares e absorção de cristal violeta. As diferenças observadas pelas respostas induzidas nos ensaios biológicos indicam que cada amostra possui um mecanismo de ação distinto, mas que culmina, de forma direta ou indireta, em alterações estruturais na membrana.

As eletromicrografias obtidas reforçam a hipótese de que o mecanismo de ação dos padrões causa alteração na estrutura morfológica da membrana celular, especialmente de *E. coli*; no entanto, sem ocasionar a lise celular. Provavelmente, a atividade desses compostos está relacionada à inibição da síntese de componentes importantes para funcionalidade da membrana.

REFERÊNCIAS

- ALEKSHUN, M. N.; LEVY, S. B. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*, [S.l.], vol. 128, n. 6, p. 1037-1050, mar. 2007.
- ALMEIDA, N. A. Óleos essenciais e desenvolvimento sustentável na Amazônia: uma aplicação da matriz de importância e desempenho. **Reflexões Econômicas**, Ilhéus, vol. 2, n. 2, p. 136-158, abr./ set. 2016.
- ANDRADE, M. A. et al. Biological activity of the essential oils from *Cinnamodendron dinisii* and *Siparuna guaianensis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, vol. 46, n. 1, p. 189-194, jan./ mar. 2015.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, [S.l.], vol. 46, n. 2, p. 446-475, fev. 2008.
- BANG, H. B. et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of cinnamaldehyde. **Microbial Cell Factories**, [S.l.], vol. 15, n. 1, p.16-27, jan. 2016.
- BATISTA, L. R. **Toxinfecções alimentares**. 1a ed. Lavras, MG: Editora UFLA, 2014, 126 p.
- BOUWMEESTER, H. J. et al. Biosynthesis of the monoterpenes limonene and carvone in the fruit of caraway: I. Demonstration of enzyme activities and their changes with development. **Plant Physiology**, [S.l.], vol. 117, n. 3, p. 901-912, jul. 1998.
- BRAHMKSHATRIYA, P. P.; BRAHMKSHATRIYA, P. S. Terpenes: Chemistry, Biological Role, and Therapeutic Applications, In: RAMAWAT, K. G.; MÉRILLON, J. M. (ed.). **Natural Products**, Berlin, Heidelberg: Springer, p. 2665-2684, mai. 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil**. Jun, 2018. Disponível em: BRASIL. Ministério da Saúde. **Doenças transmitidas por alimentos: causas, sintomas, tratamento e prevenção**. 2018. <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/julho/02/Apresentacao-Surtos-DTA-Junho-2018.pdf>> Acesso em 02/01/2019.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil**. Informe 2018. Fev, 2019. Disponível em: BRASIL. Ministério da Saúde. **Doenças transmitidas por alimentos: causas, sintomas, tratamento e prevenção**. 2019. <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/fevereiro/15/Apresenta---o-Surtos-DTA---Fevereiro-2019.pdf>> Acesso em 17/02/2019.
- BRNAWI, W. I. et al. Antimicrobial activity of leaf and bark cinnamon essential oils against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* in broth system and on celery. **Journal of Food Processing and Preservation**, [S.l.], vol. 43, n. 3, p. e13888, jan. 2019.
- CALO, J. R. et al. Essential oils as antimicrobials in food systems – A review. **Food Control**, [S.l.], vol. 54, p. 111-119, ago. 2015.
- CAO, X. et al. Metabolic engineering of oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for limonene overproduction. **Biotechnology for Biofuels**, [S.l.], vol. 9, n. 1, p. 214-224, out. 2016.

CARVALHO, I. T.; ESTEVINHO, B. N.; SANTOS, L. Application of microencapsulated essential oils in cosmetic and personal healthcare products - a review. **International Journal of Cosmetic Science**, [S.l.], vol. 38, n. 2, p. 109-119, abr. 2016.

CARVALHO, C. C. C. R.; FONSECA, M. M. R. Carvone: Why and how should one bother to produce this terpene. **Food Chemistry**, [S.l.], vol. 95, n. 3, p. 413-422, abr. 2006.

COSTA, R. R. P. Safrol e eugenol: Estudo da reatividade química e uso em síntese de produtos naturais biologicamente ativos e seus derivados. **Química Nova**, São Paulo, vol. 23, n. 3, p.357-369, mai./ jun. 2000.

CUI, H et al. Antimicrobial activity and mechanisms of *Salvia sclarea* essential oil. **Botanical Studies**, [S.l.], vol. 56, n. 1, p. 16-23, jun. 2015.

CUI, H. et al. Antibacterial activity and mechanism of *Chuzhou chrysanthemum* essential oil. **Journal of Functional Foods**, [S.l.], vol 48, p. 159-166, set. 2018.

DEVI, K. P. et al. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. **Journal of Ethnopharmacology**, [S.l.], vol. 130, n. 1, p. 107-115, jul. 2010.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 2a ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2009. 514 p.

DIDELOT, X. et al. Within-host evolution of bacterial pathogens. **Nature Reviews Microbiology**, [S.l.], vol. 14, n. 3, p. 150-162, jan. 2016.

DUTRA, R. C. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological research**, [S.l.], vol. 112, p. 4-29, out. 2016.

EATON, J. W.; BATEMAN, D.; HAUBERG, S. **Gnu octave**. 3a ed. London Network Thoery, 1997.

EISENREICH, W.; ROHDICH, F.; BACHER, A. Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. **Trends in Plant Science**, [S. l.], vol. 6, n. 2, p. 78-84, fev. 2001.

ELSHARIF, S. A.; BUETTNER, A. Influence of the chemical structure on the odor characters of β -citronellol ant its oxygenated derivatives. **Food Chemistry**, [S.l.], vol. 232, p. 704-711, out. 2017.

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

FERREIRA, M. C.; FREITAS, D. F.; MOREIRA, S. A. Identificação de aflatoxinas em paçocas de amendoim comercializadas na cidade de Lavras – MG. **Revista Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, [São Paulo], vol. 35, n. 4, p. 717-722, out./dez. 2014.

FLORES, A. M. P. C.; MELO, C. B. Principais bactérias causadoras de doenças de origem alimentar. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, [Seropédica], vol. 37, n. 1, p. 65-72, mar. 2015.

FRIEDMAN, M. Chemistry and multibeneficial bioactivities of carvacrol (4-isopropyl-2-methylphenol), a component of essential oils produced by aromatic plants and spices. **Journal of agricultural and food chemistry**, [S.l.], vol. 62, n. 31, p. 7652-7670, jul. 2014.

GALLUCCI, M. N. et al. Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. **Flavour and Fragrance Journal**, [S.l.], vol. 24, n. 6, p. 348-354, set. 2009.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. **Química Nova**, [São Paulo], vol. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, [São Paulo], vol. 33, n. 3, p. 667-679, fev. 2010.

HAN, X.; PARKER, T. L. Antiinflammatory activity of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) bark essential oil in a human skin disease model. **Phytotherapy Research**, [S.l.], vol. 31, n. 7, p. 1034-1038, abr. 2017.

INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION. ISO 9235: **Aromatic natural raw materials - Vocabulary**. 2a ed., dez. 2013. 14 p.

JO, Y. et al. Physical and antimicrobial properties of trans-cinnamaldehyde nanoemulsions in water melon juice. **LWT-Food Science and Technology**, [S.l.], vol. 60, n. 1, p. 444-451, jan. 2015.

JONGEDIJK, E. et al. Biotechnological production of limonene in microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S.l.], vol. 100, n. 7, p. 2927-2938, abr. 2016.

KALEMBA, D. A. A. K.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current medicinal chemistry**, [S.l.], vol. 10, n. 10, p. 813-829, mai. 2003.

KHAKDAN, F. et al. Water deficit stress fluctuates expression profiles of 4Cl, C3H, COMT, CVOMT, and EOMT genes involved in the biosynthetic pathway of volatile phenylpropanoids alongside accumulation of methylchavicol and methyleugenol in different Iranian cultivars of basil. **Journal of Plant Physiology**, [S.l.], vol. 218, p. 74-83, nov. 2017.

KOBAYASHI, Y. et al. Inhibitory effects of geranium essential oil and its major component, citronellol, on degranulation and cytokine production by mast cells. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, [S.l.], vol. 80, n. 6, p. 1172-1178, mar. 2016.

LIN, C. et al. Complementary relationship between trans-cinnamaldehyde and trans-cinnamyl acetate and their seasonal variations in *Cinnamomum osmophloeum* ct. cinnamaldehyde. **Industrial Crops and Products**, [S.l.], vol. 127, p. 172-178, jan. 2019.

LU, D. et al. Eugenol specialty chemical production in transgenic poplar (*Populus tremula* X *P. alba*) field trials. **Plant Biotechnology Journal**, [S.l.], vol. 15, p. 970-981, jan. 2017.

MA, B. et al. Interference and Mechanism of Dill Seed Essential Oil and Contribution of Carvone and Limonene in Preventing Sclerotinia Rot of Rapeseed. **PLoS ONE**, [San Francisco, USA/ Cambridge, UK], vol. 10, n. 7, p. e0131733, jul. 2015.

MAHMOUDZADEH, M. et al. Antibacterial activity of *Carum copticum* essential oil against *Escherichia coli* O157: H7 in meat: Stx genes expression. **Current microbiology**, [S.l.], vol. 73, n. 2, p. 265-272, ago. 2016.

MEDEIROS, V. P. B. et al. Identificação da microbiota fúngica anemófila em uma indústria de polpas de frutas e susceptibilidade antifúngica a terpenos. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, [São Paulo], vol. 74, n. 3, p. 266-273, jul./set. 2015.

MELO, E. S. et al. Doenças transmitidas por alimentos e principais agentes bacterianos envolvidos em sustos no Brasil: revisão. **Pubvet**, [Maringá], vol. 12, n. 10, ano 191, p. 1-9, out. 2018.

MIGUEL, M. G. C. P. et al. Cocoa fermentation: Microbial identification by MALDI-TOF MS, and sensory evaluation of produced chocolate. **LWT – Food Science and Technology**, [S.l.], vol. 77, p. 362-369, abr. 2017.

MIKSUSANTI, B. S. L. et al. Mode of action Temu Kunci (*Kaempferia pandurata*) essential oil on *E. coli* K 1.1 cell determined by leakage of material cell and salt tolerance assays. **Hayati Journal of Biosciences**, [S.l.], vol. 15, n. 2, p. 56-60, jun. 2008.

MILADI, H. et al. Synergistic effect of eugenol, carvacrol, thymol, p-cymene and γ -terpinene on inhibition of drug resistance and biofilm formation of oral bacteria. **Microbial pathogenesis**, [S.l.], vol. 112, p. 156-163, nov. 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Norma Técnica N° 295/2013, de agosto de 2013. **Consultoria Jurídica/ Advocacia Geral da União**, Brasília, DF, ago. 2013. 3 p. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/agosto/28/Cloranfenicol.pdf>>, acesso em 29/03/2019.

MIRANDA, C. A. S. F. et al. Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento de espécies patogênicas. **Revista Ciência Agrônômica**, [Fortaleza], vol. 47, n. 1, p. 213-220, jan./mar. 2016.

MOREIRA, M. D. et al. Uso de inseticidas botânicos no controle de pragas. In: VENZON, M.; PAULA JÚNIOR, T.J.; PALLINI, A. (Ed.). **Controle alternativo de pragas e doenças**. Viçosa: EPAMIG/CTZM, vol. 1, p. 89-120, 2006.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). **Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline**. NCCLS document M26-A. 1a ed. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 1999.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard**. NCCLS document M7-A6. Tradução de Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). 6a ed. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA, 2003a.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard**.

NCCLS document M2-A8. Tradução de Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). 8a ed. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003b.

NAZZARO, F. et al. Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. **Pharmaceuticals**, [S.l.], vol. 6, n. 12, p. 1451-1474, nov. 2013.

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

NGUYEN, H. V. et al. *Litsea cubeba* leaf essential oil from Vietnam: chemical diversity and its impacts on antibacterial activity. **Letters in Applied Microbiology**, [S.l.], vol. 66, n. 3, p. 207-214, dez. 2017.

NOWOTARSKA, S. W. et al. Mechanisms of antimicrobial action of cinnamon and oregano oils, cinnamaldehyde, carvacrol, 2,5-dihydroxybenzaldehyde, and 2-hydroxy-5-methoxybenzaldehyde against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map). **Foods**, [S.l.], vol. 6, n. 9, p. 72-88, ago. 2017

OBEREMOK, V. V. et al. A short history of insecticides. **Journal of Plant Protection Research**, [Warsaw], vol. 55, n. 3, p. 221-226, jul. 2015.

O'BYRNE, C. P.; BOOTH, I. R. Osmoregulation and its importance to food-borne microorganisms. **International Journal of Food Microbiology**, [S.l.], vol. 74, n. 3, p. 203-216, abr. 2002.

OLIVEIRA, A. B. A. et al. Doenças transmitidas por alimentos, principais agentes etiológicos e aspecto gerais: uma revisão. **Revista HCPA**, Porto Alegre, vol. 30, n. 3, p. 279-285, jul./set. 2010.

OLIVEIRA, M. M. M. et al. Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface and biotransfer potential. **Brazilian Journal of Microbiology**, [São Paulo], vol. 41, n. 1, p. 97-106, jan./ mar. 2010.

OLIVEIRA, M. M. M. et al. Morphological alterations in sessile cells of *Listeria monocytogenes* after treatment with *Cymbopogon* sp. essential oils. **Magistra**. Cruz das Almas, vol. 26, n. 3, p. 385-392, jul./set. 2014.

OOI, L. S. M. et al. Antimicrobial activities of cinnamon oil and cinnamaldehyde from the Chinese medicinal herb *Cinnamomum cassia* Blume. **The American journal of Chinese medicine**, [S.l.], vol. 34, n. 3, p. 511-522, jan. 2006.

PATRA, J. K.; BAEK, K. Antibacterial activity and action mechanism of the essential oil from *Enteromorpha linza* L. against foodborne pathogenic bacteria. **Molecules**, [S.l.], vol. 21, n. 3, p. 388-399, mar. 2016.

PAUL, S. et al. *Trachyspermum ammi* (L.) fruit essential oil influencing o membrane permeability and surface characteristics in inhibiting food-borne pathogens. **Food Control**, [S.l.], vol. 22, n. 5, p. 725-731, mai. 2011.

PAVELA, R.; BENELLI, G. Essential oils as ecofriendly biopesticides? Challenges and Constrains. **Trends in Plant Science**, [S.l.], vol. 21, n. 12, p. 1000-1007, dez. 2016.

PEREIRA, R. J; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, [Gurupi, TO.], vol. 3, n. 4, p.146-152, nov. 2012.

PERRICONE, M. et al. Bioactivity of essential oils: a review on their interaction with food components. **Frontiers in Microbiology**, [Lausanne, Switzerland], vol. 6, p. 76-82, fev. 2015.

PORTO, C. et al. (R)-(-)-carvone and (1R, 4R)-trans-(+)-dihydrocarvone from *Poiretia latifolia* vogel. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [São Paulo], vol. 21, n. 5, p. 782-786, 2010.

POULOUSE, A. J.; CROTEAU, R. Biosynthesis of aromatic monoterpenes: conversion of γ -terpinene to p-cymene and thymol in *Thymus vulgaris* L. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [S.l.], vol. 187, n. 2, p. 307-314, abr. 1978.

QIAO, M. et al. Review of antibiotic resistance in China and its environment. **Environment International**, [S.l.], vol. 110, p. 160-172, jan. 2018.

RABINOVITCH, L.; OLIVEIRA, E. J. **Coletânea de procedimentos técnicos e metodologias empregadas para o estudo de *Bacillus* e gêneros esporulados aeróbios correlatos**. 1a ed. Rio de Janeiro: Montenegro Comunicação. 2015, 160p.

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

REZENDE, D. A. C. S. et al. Essential oils from *Mentha piperita*, *Cymbopogon citratus*, *Rosmarinus officinalis*, *Peumus boldus* and *Foeniculum vulgare*: Inhibition of phospholipase A₂ and cytotoxicity to human erythrocytes. **American Journal of Plant Sciences**, [S.l.], vol. 8, n. 9, p.2196-2201, ago. 2017a.

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**, [S.l.], vol. 8, n. 2, p. 154-170, jan. 2017b.

RHAYOUR, K. et al. The mechanism of bactericidal action of oregano and clove essential oils and of their phenolic major components on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. **Journal of Essential Oils Resource**, [S.l.], vol. 15, n. 5, p. 356-362, set. 2003.

ROCHA, F. A. G. et al. O uso terapêutico da flora na história mundial. **Holos**, Natal, vol. 1, n. 31, p. 49-61, mar.2015.

ROMERO, J. C. L. et al. Antibacterial effects and mode of action of selected essential oils components against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, [S.l.], vol. 2015, p. 1-9, 2015.

SAAD, N. Y.; MULLER, C. D.; LOBSTEIN, A. Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. **Flavour and fragrance journal**, [S.l.], vol. 28, n. 5, p. 269-279, mai. 2013.

SAKKAS, H.; PAPADOPOULOU, C. Antimicrobial activity of Basil, Oregano, and Thyme essential oils. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, [Seoul, Korea], vol. 27, n. 3, p. 429-438, mar. 2017.

SANTANA, E. H. W. et al. Estafilococos em alimentos. **Arquivos do Instituto de Biologia**, São Paulo, vol. 77, n. 3, p. 545-554, jul./ set. 2010.

SANTIAGO, J. A. et al. Essential oil from *Chenopodium ambrosioides* L.: secretory structures, antibacterial and antioxidant activities. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, Maringá, vol. 38, n. 2, p. 139-147, abr./ jun. 2016.

SANTORO, G. F. et al. *Trypanosoma cruzi*: Activity of essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. **Experimental Parasitology**, [S.l.], vol. 116, n. 3, p. 283-290, jul. 2007.

SEWELL, R. D. E.; RAFIEIAN-KOPAEI, M. The history and ups and downs of herbal medicine usage. **Journal of HerbMed Pharmacology**, [S.l.], vol. 3, n. 1, p. 1-3, jun. 2014.

SHEN, S. Effects of cinnamaldehyde on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* membrane. **Food Control**, [S.l.], vol. 47, p. 196-202, jan. 2015.

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

SILVA, L. F. et al. Essential Oils from *Mentha viridis* (L). L. and *Mentha pulegium* L.: Cytogenotoxic Effects on Human Cells. **American Journal of Plant Sciences**, [S.l.], vol. 8, n. 6, p. 1423-1437, mai. 2017.

SIMÕES, C. M. O. et al (org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6a ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. 1104 p.

SIMÕES, D. et al. Recent advances on antimicrobial wound dressing: A review. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [S.l.], vol. 127, p. 130-141, jun. 2018.

SOLA, M. C. et al. Mecanismos de *quorum sensing* e sua relevância na microbiologia de alimentos. **Enciclopédia Biosfera**, Goiania, vol. 8, n. 14, p. 1419-1441, jun. 2012.

SOUZA, V. G. L. et al. Activity of chitosan-montmorillonite bionanocomposites incorporated with rosemary essential oil: From in vitro assays to application in fresh poultry meat. **Food Hydrocolloids**, [S.l.], vol. 89, p. 241-252, abr. 2019.

TEIXEIRA, M. L. et al. Essential Oils from *Lippia organoides* Kunth. and *Mentha spicata* L.: Chemical Composition, Insecticidal and Antioxidant Activities. **American Journal of Plant Sciences**, [S.l.], vol. 5, p. 1181-1190, abr. 2014.

;

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Tradução de Silva, A. M. et al. 10a ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TRINDADE, H. et al. Chemotypes and terpene synthase genes in *Thymus* genus: State of art. **Industrial Crops and Products**, [S.l.], vol. 124, p.530-547, nov. 2018.

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**, [S.l.], vol. 68, n. 4, p. 1561-1568, abr. 2002.

ULTEE, A.; KETS, E. P. W.; SMID, E. J. Mechanism of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, [S.l.], vol. 65, n.10, p. 4606-4610, out. 1999.

VAN VUUREN, S. F.; VILJOEN, A. M. Antimicrobial activity of limonene enantiomers and 1,8-cineole alone and in combination. **Flavour and Fragrance Journal**, [S.l.], vol. 22, n. 6, p. 540-544, out. 2007.

VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. **Pharmacy and Therapeutics**, [S.l.], vol. 40, n. 4, p. 277-283, abr. 2015.

XU, J G. et al. Chemical composition, antibacterial properties and mechanism of action of essential oil from clove buds against *Staphylococcus aureus*. **Molecules**, [S.l.], vol. 21, n. 9, p. 1194-1206, set. 2016.

YANG, X.; KHAN, I.; KANG, S. C. Chemical composition, mechanism of antibacterial action and antioxidant activity of leaf essential oil of *Forsythia koreana* deciduous shrub. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, [S.l.], vol. 8, n. 9, p. 694-700, set. 2015.

YE, H. et al. Synergistic interactions of cinnamaldehyde in combination with carvacrol against food-borne bacteria. **Food Control**, [S.l.], vol. 34, n. 2, p. 619-623, dez. 2013.

ZHANG, J. et al. Antibacterial Activity and Mechanism of Action of Black Pepper Essential Oil on Meat-Borne *Escherichia coli*. **Frontiers in Microbiology**, [Lausanne, Switzerland], vol. 7, p. 2094, jan. 2017.

APÊNDICE

APÊNDICE A – INFLUÊNCIA DOS PADRÕES NA CAPACIDADE DE TOLERÂNCIA A SAL DE *Escherichia coli*.

Tabela 1A – Análise de variância (variável analisada: log (UFC mL⁻¹))

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Amostra	4	5,6855	1,4214	31,714	0
Teor de sal	1	0,4123	0,4123	9,198	0,0033
Amostra x Teor de sal	4	0,3921	0,0980	2,187	0,0780
Erro	79	3,5407	0,0448		
Total corrigido	88	10,0305			
CV(%) =	3,95				
Média geral:	5,3663		Número de observações:		89

Legenda: FV: fatores de variação; GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados, QM: quadrados médios, CV: coeficiente de variação. Fonte: Do autor (2019)

Tabela 2A – Análise de variância (análise do desdobramento de amostra dentro de cada nível de teor de sal)

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Amostra /1	4	1,8199	0,4550	10,151	0
Amostra /2	4	4,2577	1,0644	23,750	0
Erro	79	3,5407	0,0448		

Fonte: Do autor (2019)

Tabela 3A – Análise de variância (análise do desdobramento de teor de sal dentro de cada nível de amostra)

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Teor de sal /1	1	0,5201	0,5201	11,604	0,0010
Teor de sal /2	1	0,0167	0,0167	0,373	0,5430
Teor de sal /3	1	0,0251	0,0251	0,560	0,4566
Teor de sal /4	1	0,1305	0,1305	2,912	0,0919
Teor de sal /5	1	0,1119	0,1119	2,497	0,1181
Erro	79	3,5407	0,0448		

Fonte: Do autor (2019)

**APÊNDICE B – INFLUÊNCIA DOS PADRÕES NA CAPACIDADE DE
TOLERÂNCIA A SAL DE *Staphylococcus aureus*.**

Tabela 1B – Análise de variância (variável analisada: log (UFC mL⁻¹))

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Amostra	5	50,0156	10,0031	304,050	0
Teor de sal	2	0,0690	0,0345	1,048	0,3532
Amostra x Teor de sal	10	0,6003	0,0600	1,825	0,0607
Erro	151	4,9678	0,3290		
Total corrigido	168				
CV(%) =	3,72				
Média geral:	4,8750		Número de observações:		169

Fonte: Do autor (2019)

Tabela 2B – Análise de variância (análise do desdobramento de amostra dentro de cada nível de teor de sal)

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Amostra /1	5	15,7669	3,1534	95,849	0
Amostra /2	5	16,9965	3,3993	103,323	0
Amostra /3	5	17,8526	3,5705	108,527	0
Erro	151	4,9678	0,0329		

Fonte: Do autor (2019)

Tabela 3B – Análise de variância (análise do desdobramento de teor de sal dentro de cada nível de amostra)

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Teor de sal /1	2	0,0158	0,0079	0,241	0,7861
Teor de sal /2	2	0,0441	0,0221	0,671	0,5096
Teor de sal /3	2	0,1252	0,0626	1,903	0,1501
Teor de sal /4	2	0,0149	0,0075	0,227	0,7971
Teor de sal /5	2	0,4155	0,2078	6,315	0,0022
Teor de sal /6	2	0,0536	0,0268	0,815	0,4408
Erro	151	4,9678	0,0329		

Fonte: Do autor (2019)

**APÊNDICE C – INFLUÊNCIA DOS PADRÕES NA LIBERAÇÃO DE CONTEÚDOS
CELULARES DE *Escherichia coli*.**

Tabela 1C – Liberação de constituintes celulares por *E. coli*. (Continua)

Amostra	Absorbância dos tratamentos a cada período de incubação ²		
	0 horas	1 hora	2 horas
Carvacrol (0,39 ¹)	0,4177 ± 0,0048 bB	0,4742 ± 0,0057 bD	0,4488 ± 0,0047 dC
Carvacrol (0,19 ¹)	0,4051 ± 0,0107 bC	0,4869 ± 0,0083 bD	0,4741 ± 0,0325 eD
t-cinamaldeído (0,39 ¹)	0,4121 ± 0,0146 bC	0,5156 ± 0,0354 cD	0,4053 ± 0,0087 cC
t-cinamaldeído (0,19 ¹)	0,4177 ± 0,0141 bD	0,6146 ± 0,0092 eE	0,3627 ± 0,0220 aC
Eugenol (0,78 ¹)	0,4315 ± 0,0074 bD	0,4888 ± 0,0087 bE	0,4786 ± 0,0051 eE
Eugenol (0,39 ¹)	0,4321 ± 0,0104 bD	0,5461 ± 0,0140 dF	0,5048 ± 0,0080 fE
Carvona (1,56 ¹)	0,4106 ± 0,0093 bB	0,4683 ± 0,0103 bD	0,3858 ± 0,0014 bA
Carvona (0,78 ¹)	0,4155 ± 0,0126 bC	0,5407 ± 0,0103 dE	0,3513 ± 0,0052 aB
<i>E. coli</i>	0,3393 ± 0,0105 aA	0,3742 ± 0,0094 aB	0,3792 ± 0,0055 bB

Tabela 1C – Liberação de constituintes celulares por *E. coli*. (Conclusão)

Amostra	Absorbância dos tratamentos a cada período de incubação ²		
	3 horas	4 horas	5 horas
Carvacrol (0,39 ¹)	0,3502 ± 0,0064 cA	0,3755 ± 0,0081 bA	0,3673 ± 0,0283 dA
Carvacrol (0,19 ¹)	0,3263 ± 0,0099 bA	0,3470 ± 0,0104 aA	0,3791 ± 0,0565 dB
t-cinamaldeído (0,39 ¹)	0,3653 ± 0,0167 cB	0,3967 ± 0,0110 cC	0,3281 ± 0,0130 cA
t-cinamaldeído (0,19 ¹)	0,3234 ± 0,0121 bB	0,3958 ± 0,0054 cD	0,2325 ± 0,0142 aA
Eugenol (0,78 ¹)	0,3360 ± 0,0115 bB	0,3835 ± 0,0131 bC	0,2923 ± 0,0098 bA
Eugenol (0,39 ¹)	0,2881 ± 0,0111 aB	0,3469 ± 0,0116 aC	0,2375 ± 0,0086 aA
Carvona (1,56 ¹)	0,3632 ± 0,0058 cA	0,3816 ± 0,0085 bA	0,4306 ± 0,0106 eC
Carvona (0,78 ¹)	0,2927 ± 0,0070 aA	0,3510 ± 0,0081 aB	0,4497 ± 0,0150 eD
<i>E. coli</i>	0,3967 ± 0,0055 dC	0,4193 ± 0,0047 cD	0,5173 ± 0,0139 fE

Legenda: ¹µL mL⁻¹. ²Médias precedidas do desvio padrão, letras **minúsculas** iguais na **coluna**, não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância; letras **maiúsculas** iguais na **linha**, não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância. Fonte: Do autor (2019).

Tabela 2C – Análise de variância (variável analisada: absorvância)

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	8	0,0059	0,0007	3,433	0,0011
Incubação – em horas	5	0,6026	0,1205	558,952	0
Tratamento x Incubação	40	0,6201	0,0155	71,892	0
Erro	162	0,0349	0,0002		
Total corrigido	311	1,2636			
CV(%) =	3,66				
Média geral:	0,4010		Número de observações:		216

Fonte: Do autor (2019)

Tabela 3C – Análise de variância (análise do desdobramento de tratamento dentro de cada nível de incubação – em horas)

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento /1	8	0,0245	0,0031	14,185	0
Tratamento /2	8	0,1398	0,0175	81,068	0
Tratamento /3	8	0,1017	0,0127	58,943	0
Tratamento /4	8	0,0395	0,0049	22,884	0
Tratamento /5	8	0,0203	0,0025	11,777	0
Tratamento /6	8	0,3002	0,0375	174,038	0
Erro	162	0,0349	0,0002		

Fonte: Do autor (2019)

Tabela 4C – Análise de variância (análise do desdobramento de Incubação – em horas dentro de cada nível de tratamento)

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Incubação /1	5	0,0486	0,0097	45,097	0
Incubação /2	5	0,0867	0,0174	80,463	0
Incubação /3	5	0,2937	0,0059	27,240	0
Incubação /4	5	0,1552	0,0310	143,941	0
Incubação /5	5	0,0753	0,0151	69,799	0
Incubação /6	5	0,1240	0,0248	115,001	0
Incubação /7	5	0,2992	0,0598	277,534	0
Incubação /8	5	0,0794	0,0159	73,605	0
Incubação /9	5	0,3250	0,0650	301,412	0
Erro	162	0,0349	0,0002		

Fonte: Do autor (2019)

**APÊNDICE D – INFLUÊNCIA DOS PADRÕES NA LIBERAÇÃO DE CONTEÚDOS
CELULARES DE *Staphylococcus aureus*.**

Tabela 1D – Liberação de constituintes celulares por *S. aureus*. (Continua)

Amostra	Absorbância dos tratamentos a cada período de incubação ²		
	0 horas	1 hora	2 horas
Carvacrol (0,39 ¹)	0,4064 ± 0,0092 cA	0,4086 ± 0,0121 bA	0,3992 ± 0,0051 cA
Carvacrol (0,19 ¹)	0,4172 ± 0,0084 dC	0,4124 ± 0,0070 bC	0,3991 ± 0,0132 cB
t-cinamaldeído (0,39 ¹)	0,3936 ± 0,0039 bA	0,4021 ± 0,0055 aA	0,3937 ± 0,0051 cA
t-cinamaldeído (0,19 ¹)	0,3757 ± 0,0065 aA	0,4091 ± 0,0148 bB	0,3650 ± 0,0085 bA
Eugenol (0,78 ¹)	0,4125 ± 0,0118 dB	0,4187 ± 0,0087 bB	0,3463 ± 0,0199 aA
Eugenol (0,39 ¹)	0,4197 ± 0,0051 dB	0,4201 ± 0,0079 bB	0,3710 ± 0,0303 bA
Carvona (1,56 ¹)	0,4235 ± 0,0073 dB	0,4218 ± 0,0059 bB	0,4178 ± 0,0045 dB
Carvona (0,78 ¹)	0,4066 ± 0,0030 cA	0,4172 ± 0,0048 bB	0,4190 ± 0,0079 dB
β-citronelol (0,39 ¹)	0,4188 ± 0,0036 dB	0,4140 ± 0,0091 bB	0,4040 ± 0,0049 cA
β-citronelol (0,19 ¹)	0,4172 ± 0,0055 dB	0,4225 ± 0,0049 bB	0,4058 ± 0,0034 dA
<i>S. aureus</i>	0,4049 ± 0,0016 cA	0,3975 ± 0,0044 aA	0,3896 ± 0,0081 cA

Tabela 1D – Liberação de constituintes celulares por *S. aureus*. (Conclusão)

Amostra	Absorbância dos tratamentos a cada período de incubação ²		
	3 horas	4 horas	5 horas
Carvacrol (0,39 ¹)	0,4212 ± 0,0078 bB	0,4124 ± 0,0084 bB	0,4009 ± 0,0047 aA
Carvacrol (0,19 ¹)	0,3840 ± 0,0210 aA	0,4227 ± 0,0061 cC	0,4120 ± 0,0065 bC
t-cinamaldeído (0,39 ¹)	0,4047 ± 0,0102 aA	0,4269 ± 0,0058 cB	0,4268 ± 0,0116 bB
t-cinamaldeído (0,19 ¹)	0,4083 ± 0,0136 aB	0,4463 ± 0,0199 dC	0,4377 ± 0,0076 bC
Eugenol (0,78 ¹)	0,4302 ± 0,0111 bB	0,4216 ± 0,0045 cB	0,4138 ± 0,0076 bB
Eugenol (0,39 ¹)	0,4310 ± 0,0070 bB	0,3787 ± 0,0248 aA	0,4232 ± 0,0070 bB
Carvona (1,56 ¹)	0,3967 ± 0,0048 aA	0,3936 ± 0,0023 aA	0,3946 ± 0,0088 aA
Carvona (0,78 ¹)	0,4090 ± 0,0119 aA	0,3947 ± 0,0083 aA	0,4021 ± 0,0080 aA
β-citronelol (0,39 ¹)	0,4037 ± 0,0067 aA	0,4038 ± 0,0055 bA	0,4047 ± 0,0024 aA
β-citronelol (0,19 ¹)	0,4014 ± 0,0066 aA	0,4036 ± 0,0051 bA	0,3983 ± 0,0011 aA
<i>S. aureus</i>	0,3985 ± 0,0027 aA	0,4281 ± 0,0035 cB	0,4290 ± 0,0076 bB

Legenda: ¹μL mL⁻¹. ²Médias precedidas do desvio padrão, letras **minúsculas** iguais na **coluna**, não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância; letras **maiúsculas** iguais na **linha**, não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância. Fonte: Do autor (2019).

Tabela 2D- Análise de variância (variável analisada: absorvância)

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	10	0,00004	0,000004	0,045	1
Incubação – em horas	5	0,0144	0,0029	29,982	0
Tratamento x Incubação	50	0,0623	0,0012	12,925	0
Erro	198	0,0191	0,0001		
Total corrigido	263				
CV(%) =	2,41				
Média geral:	0,4078		Número de observações:		264

Fonte: Do autor (2019)

Tabela 3D – Análise de variância (análise do desdobramento de tratamento dentro de cada nível de incubação – em horas)

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento /1	10	0,0078	0,0008	8,080	0
Tratamento /2	10	0,0026	0,0003	2,750	0,0034
Tratamento /3	10	0,0204	0,0020	21,168	0
Tratamento /4	10	0,0083	0,0008	8,573	0
Tratamento /5	10	0,0150	0,0015	15,572	0
Tratamento /6	10	0,0082	0,0008	8,529	0
Erro	198	0,0191	0,0001		

Fonte: Do autor (2019)

Tabela 4D – Análise de variância (análise do desdobramento de Incubação – em horas dentro de cada nível de tratamento) (Continua)

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Incubação /1	5	0,0013	0,0003	2,722	0,0209
Incubação /2	5	0,0040	0,0008	8,227	0
Incubação /3	5	0,0042	0,0008	8,633	0
Incubação /4	5	0,0017	0,0003	3,486	0,0048
Incubação /5	5	0,0186	0,0037	38,588	0
Incubação /6	5	0,0131	0,0026	27,190	0
Incubação /7	5	0,0056	0,0011	11,579	0
Incubação /8	5	0,0009	0,0002	1,794	0,1153
Incubação /9	5	0,0018	0,0004	3,798	0,0026
Incubação /10	5	0,0047	0,0009	9,706	0
Incubação /11	5	0,02100	0,0042	43,512	0
Erro	210	0,0191	0,0001		

Fonte: Do autor (2019)

APÊNDICE E – INFLUÊNCIA DOS PADRÕES NA ABSORÇÃO DE CRISTAL VIOLETA POR *Escherichia coli* E *Staphylococcus aureus*.

Tabela 1E – Análise de variância

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	10	1,421E-14	1,421E-15	0	1
Cristal violeta	1	1633	1633	174,541	0
Tratamento x Cristal violeta	10	16484	1648	176,176	0
Erro	66	617	9,3568		
Total corrigido	87	18735			
CV(%) =	6,12				
Média geral:	50		Número de observações:		88

Fonte: Do autor (2019)

Tabela 2E – Análise de variância (análise do desdobramento de tratamento dentro de cada nível de % cristal violeta)

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento /1	10	8242	824	88,09	0
Tratamento /2	10	8242	824	88,09	0
Erro	66	617	9,3568		

Fonte: Do autor (2019)

Tabela 3E – Análise de variância (análise do desdobramento de % de cristal violeta dentro de cada nível de tratamento)

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Cristal violeta /1	1	88,58	88,58	9,47	0,0030
Cristal violeta /2	1	127,52	127,52	13,63	0,0005
Cristal violeta /3	1	78,87	78,88	8,43	0,0050
Cristal violeta /4	1	1069	1069,99	114,36	0
Cristal violeta /5	1	29,26	29,26	3,13	0,0816
Cristal violeta /6	1	13361	13361,22	1427,97	0
Cristal violeta /7	1	1,86	1,86	0,29	0,6570
Cristal violeta /8	1	120,75	120,75	12,91	0,0006
Cristal violeta /9	1	2549,69	2549,69	272,59	0
Cristal violeta /10	1	683,76	683,76	73,08	0
Cristal violeta /11	1	6,09	6,09	0,65	0,4227
Erro	66	617,55	9,36		

Fonte: Do autor (2019)