



GISLAINE CRISTINA PEIXOTO DE CARVALHO

**AVALIAÇÃO BIOLÓGICA E MECANISMO DE AÇÃO DOS
ÓLEOS ESSENCIAIS DAS ESPÉCIES VEGETAIS *Prunus
persica* E *Satureja montana* SOBRE *Escherichia coli*,
Staphylococcus aureus E *Penicillium expansum***

**LAVRAS - MG
2024**

GISLAINE CRISTINA PEIXOTO DE CARVALHO

**AVALIAÇÃO BIOLÓGICA E MECANISMO DE AÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS
DAS ESPÉCIES VEGETAIS *Prunus persica* E *Satureja montana* SOBRE *Escherichia
coli*, *Staphylococcus aureus* E *Penicillium expansum***

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 obter o título de Mestre.

Profa. Dra. Maria das Graças Cardoso
Orientadora

**LAVRAS - MG
2024**

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

Carvalho, Gislaine Cristina Peixoto de.

Avaliação biológica e mecanismo de ação dos óleos essenciais
das espécies vegetais *Prunus persica* e *Satureja montana* sobre
Escherichia coli, *Staphylococcus aureus* e *Penicillium expansum*. /
Gislaine Cristina Peixoto de Carvalho. - 2024.

59 p.

Orientador(a): Maria das Graças Cardoso.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2024.

Bibliografia.

1. Óleos essenciais. 2. Produtos Naturais. 3. Atividade
Biológica. I. Cardoso, Maria das Graças. II. Título.

GISLAINE CRISTINA PEIXOTO DE CARVALHO

**AVALIAÇÃO BIOLÓGICA E MECANISMO DE AÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS
DAS ESPÉCIES VEGETAIS *Prunus persica* E *Satureja montana* SOBRE *Escherichia*
coli, *Staphylococcus aureus* E *Penicillium expansum***

**BIOLOGICAL EVALUATION AND MECHANISM OF ACTION OF ESSENTIAL
OILS FROM THE PLANT SPECIES *Prunus persica* AND *Satureja montana* ON
Escherichia coli, *Staphylococcus aureus* AND *Penicillium expansum***

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 obter o título de Mestre.

APROVADA em 2 de agosto de 2024.
Dra. Maria das Graças Cardoso, UFLA
Dr. Luis Roberto Batista, UFLA
Dra. Danubia Aparecida Selvatti Rezende, UFLA
Dr. David Lee Nelson, UFVJM

Profa. Dra. Maria das Graças Cardoso
Orientadora

**LAVRAS - MG
2024**

A Deus, por sempre estar comigo, e me fortalecer todos os dias!

À minha vó, que sempre me incentivou a estudar, hoje está guardada em minhas lembranças e memórias!!

À minha irmã, Gilmara, por sempre me incentivar e aconselhar!

Aos meus pais, Gilmar e Patrícia, pelo incentivo em continuar!

À minha orientadora, Profa. Maria das Graças Cardoso, pelos ensinamentos e por ter aberto as portas do Laboratório para mim!

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ser minha luz em momentos que mais precisei.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) pela oportunidade e pela infraestrutura, juntamente com o Departamento de Química (DQI) e o Laboratório de Química Orgânica - Óleos Essenciais.

Aos órgãos de fomento, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior do Ministério da Educação (Capes), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio e suporte.

À minha orientadora, Maria das Graças Cardoso, por aceitar me orientar tão prontamente, pelo suporte dado durante esse período, pelos ensinamentos que foram adquiridos em seu Laboratório.

À toda minha família, que esteve presente comigo durante esse período, que me incentivou a sempre lutar pelos meus objetivos.

Aos meus tios Maria da Conceição e José Mariano, por também estarem presente na minha jornada e me incentivarem.

À minha afilhada, Mariana, que em vários momentos de tristeza foi capaz de me alegrar com sua delicadeza e alegria de criança.

À Laura, minha amiga de casa que sempre esteve comigo ajudando-me a superar os momentos difíceis, e dando-me forças.

Às minhas amigas de Laboratório Isadora, Maria Augusta, Danubia e Joyce, que estiveram comigo nos momentos felizes e difíceis; e sempre acreditaram em mim.

Aos meus amigos da faculdade Shênnia, Wanderléia, Marcos, Joyce, Mariane, Carlos Milagres e Clério, agradeço a todos pelos momentos lindos que passamos juntos, por sempre estarmos nos fortalecendo, seja em momentos tristes ou felizes.

Aos membros da banca, pelas contribuições realizadas, que enriqueceram meu trabalho.

À todos meus colegas de Laboratório Anna Beatriz, Sara, Carolina, Maria Luiza, Beatriz, Paloma, Giovana e Luciano, por terem me ajudado durante a execução deste trabalho. Ao pessoal do Laboratório – Unidade de Recursos Microbiológicos (Urmicro).

Enfim, a todos que estiveram comigo em vários momentos, apoiando-me de alguma forma.

RESUMO

Os produtos naturais são considerados promissores antifúngicos, antioxidantes, antibacterianos e anti-inflamatórios, fazendo com que estes sejam cada vez mais explorados. Como exemplo, têm-se os óleos essenciais, formados a partir do metabolismo secundário. Objetivou-se neste extrair, caracterizar quimicamente, bem como avaliar a atividade antioxidante, antifúngica e estudar o mecanismo de ação dos óleos essenciais de *Prunus persica* (pessegueiro) e *Satureja montana* (segurelha) sobre as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. A avaliação antioxidante foi realizada pelos testes DPPH, branqueamento do β -caroteno e poder redutor. A análise fúngica foi realizada pelo método de difusão em disco, e o mecanismo de ação, avaliado por meio de diferentes métodos como efluxo de íons potássio, diminuição de capacidade de tolerância a sal, extravasamento de conteúdos celulares absorventes em 260 nm e absorção de cristais violeta. A morfologia das bactérias alteradas pelos óleos essenciais foi analisada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). O óleo essencial de segurelha apresentou como constituintes majoritários carvacrol, p-cimeno e hexadecanol; e o óleo essencial de pêssego, o benzaldeído. Foi observado efeito bactericida e bacteriostático para ambos os óleos. O óleo essencial de segurelha mostrou-se grande potencial antioxidante e antifúngico. Nenhum dos óleos provocou efusão de íons potássio nas células bacterianas. O óleo de segurelha foi capaz de causar tolerância a sal para ambas as bactérias, contrário ao óleo de folhas de pêssego. O extravasamento de constituintes foi observado para ambos os óleos, exceto para o óleo de segurelha sobre *E. coli*. A absorção de cristal violeta foi observada mais para o óleo de pêssego do que para o óleo de segurelha, que apresentou uma leve variação. As imagens obtidas por MEV possibilitaram observar que ambos os óleos foram capazes de diminuir a quantidade de células bacterianas. Conclui-se que o óleo de segurelha mostrou um potencial antioxidante significativo, bem como antifúngico e antibacteriano, enquanto o óleo de folhas de pêssego apresentou baixo potencial antioxidante e obteve um menor potencial antifúngico e antibacteriano. Dessa forma, o mecanismo de ação dos óleos sobre as bactérias, pode ser atribuído a alterações na permeabilidade da membrana de forma direta ou indireta.

Palavras-chave: Óleos essenciais; Pessegueiro; Segurelha; Antioxidantes; Atividade biológica; Mecanismo de ação.

ABSTRACT

Natural products are considered promising antifungal, antioxidant, antibacterial, and anti-inflammatory agents, leading to their increased exploration. Essential oils, formed from secondary metabolism, serve as a notable example. The objectives of this study were to extract, chemically characterize, and evaluate the antioxidant and antifungal activity, as well as to study the mechanism of action of the essential oils from *Prunus persica* (peach tree) and *Satureja montana* (savory) on the bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Antioxidant evaluation was performed using the DPPH assay, β -carotene bleaching test, and reducing power assay. Fungal analysis was conducted using the disk diffusion method, and the mechanism of action was assessed through various methods, including potassium ion efflux, decreased salt tolerance capacity, leakage of cellular contents absorbing at 260 nm, and crystal violet uptake. The altered bacterial morphology caused by the essential oils was analyzed using Scanning Electron Microscopy (SEM). The major constituents of savory essential oil were carvacrol, p-cymene, and hexadecanol, while peach leaf essential oil primarily contained benzaldehyde. Both oils exhibited bactericidal and bacteriostatic effects. Savory essential oil demonstrated strong antioxidant and antifungal potential. Neither oil induced potassium ion efflux in bacterial cells. Savory oil caused a reduction in salt tolerance in both bacteria, unlike peach leaf oil. Leakage of cellular constituents was observed for both oils, except for savory oil on *E. coli*. Crystal violet uptake was more pronounced with peach oil than with savory oil, which showed only slight variation. SEM images revealed that both oils were capable of reducing the number of bacterial cells. It was concluded that savory oil showed significant antioxidant, antifungal, and antibacterial potential, while peach leaf oil exhibited lower antioxidant potential and lesser antifungal and antibacterial activity. Thus, the mechanism of action of the oils on bacteria can be attributed to direct or indirect alterations in membrane permeability.

Keywords: Essential oils; Natural products; Peach tree; Winter savory; Antioxidants; Biological activity; Mechanism of action.

INDICADORES DE IMPACTO

A saúde alimentar é uma das principais preocupações uma vez que a ingestão de alimentos que foram manipulados de maneira inadequada pode acarretar riscos significativos à saúde. Esses alimentos podem estar contaminados por microrganismos nocivos, que podem causar uma variedade de doenças. Então, criar alternativas para conservação de alimentos é de suma relevância. Sendo assim, avaliar os métodos de ação desses produtos sobre os microrganismos, vai definir sua eficácia e estabelecer se é possível os óleos essenciais substituírem conservantes sintéticos, que, com o tempo, trazem riscos à saúde. Outro ponto a considerar é que os óleos essenciais são biodegradáveis; diminuindo assim os impactos sobre o ambiente. Desse modo, o este trabalho não só tem um impacto direto na sociedade, mas também influencia indiretamente questões relacionadas ao meio ambiente e à saúde pública. Apresentando potencial de gerar informações valiosas que podem assegurar direitos e promover justiça para todos, contribuindo para um futuro mais saudável e sustentável.

IMPACT INDICATORS

Food safety is one of the main concerns, as the consumption of food that has been improperly handled can pose significant health risks. Such food may be contaminated by harmful microorganisms, which can cause a variety of diseases. Therefore, creating alternatives for food preservation is of utmost relevance. Evaluating the action methods of these products on microorganisms will determine their efficacy and establish whether essential oils can replace synthetic preservatives, which may pose health risks over time. Another point to consider is that essential oils are biodegradable, thus reducing environmental impacts. Consequently, this work not only has a direct impact on society but also indirectly influences issues related to the environment and public health. It has the potential to generate valuable information that can ensure rights and promote justice for all, contributing to a healthier and more sustainable future.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	Óleos Essenciais.....	13
2.1.1	Biossíntese dos Óleos Essenciais	14
2.2	Espécies Vegetais.....	18
2.2.1.	<i>Prunus persica</i> (pessegueiro).....	18
2.2.2.	<i>Satureja montana</i> (segurelha)	19
2.3	Atividade Antioxidante.....	20
2.4	Contaminação de Alimentos por Microrganismos	22
2.5	Mecanismo de ação de óleos essenciais sobre bactérias	27
3	MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1	Obtenção do Material Vegetal	29
3.2	Extração do Óleo Essencial	29
3.3	Determinação da Umidade e do Rendimento do Óleo Essencial.....	29
3.4	Caracterização Química dos Óleos Essenciais	30
3.5	Atividade Antioxidante: Diluição das Amostras.....	30
3.5.1	Atividade Antioxidante: Sequestro de Radicais Livres DPPH.....	31
3.5.2	Atividade Antioxidante: Ensaio de Branqueamento β -caroteno	31
3.5.3	Atividade Antioxidante: Método do Poder Redutor.....	32
3.6	Atividade Antifúngica - Diluição das Amostras.....	33
3.6.1	Atividade Antifúngica: Método Difusão em Disco.....	33
3.7	Atividade Antibacteriana – Diluição das Amostras.....	34
3.7.1	Atividade Antibacteriana – Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e da Concentração Mínima Bactericida (CMB)	34
3.7.2	Atividade Antibacteriana – Teste de liberação de Íons Potássio.....	35
3.7.3	Atividade Antibacteriana – Teste de Liberação de Constituintes Celulares.....	35
3.7.4	Atividade Antibacteriana – Teste da Permeabilidade da Membrana	36
3.7.5	Atividade Antibacteriana – Teste da Capacidade de Tolerância a Sal.....	37
3.7.6	Atividade Antibacteriana – Avaliação da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	37
3.8	Análise Estatística	38
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39

4.1	Rendimento e Umidade	39
4.2	Caracterização Química	40
4.3	Testes Antioxidantes	41
4.4	Atividade antifúngica	43
4.5	Testes Antibacterianos	44
4.5.1	Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB).....	44
4.5.2	Teste liberação de íons potássio	46
4.5.3	Teste de liberação de constituintes celulares absorventes em 260 nm	47
4.5.4	Teste da permeabilidade da membrana.....	48
4.5.5	Teste de tolerância ao sal.....	49
4.5.6	Avaliação da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	50
5	CONCLUSÕES	53
	REFERÊNCIAS	54

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, um dos grandes problemas das indústrias alimentícias é a contaminação por microrganismos, já que os metabólitos secundários produzidos por esses organismos causam sérios problemas tanto para a indústria quanto para a saúde humana. Para evitar esse problema, são utilizados conservantes e antibióticos sintéticos que prolongam a vida útil dos produtos.

A oxidação dos produtos também é considerada um problema para as indústrias. Existem dois processos de oxidação: um ocorre pela peroxidação lipídica, que faz com que os produtos fiquem rançosos e sejam descartados, e o outro ocorre quando o produto entra em contato com o oxigênio do ar, reduzindo seu tempo de prateleira e consumo.

Dessa forma, a busca por alternativas aos conservantes sintéticos torna-se necessária. E o uso de produtos naturais tem mostrado resultados benéficos, especialmente estudos com óleos essenciais (OE), que apresentam uma ampla gama de propriedades, como antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória e antioxidante.

Devido à rápida oxidação dos alimentos e à contaminação por microrganismos durante a manipulação, estudar o mecanismo de ação dos óleos essenciais sobre esses microrganismos e propor um novo produto capaz de inibi-los ou até mesmo eliminá-los é de suma relevância. Isso evitaria perdas para os produtores e impediria que os fungos produzissem metabólitos secundários que representam riscos à saúde.

Mediante o exposto, objetivou neste trabalho extrair, caracterizar quimicamente os óleos essenciais de *Satureja montana* (segurelha) e de *Prunus persica* (pessegueiro); bem como avaliar a ação antioxidante pelo método de sequestro de radicais livres DPPH, branqueamento do β -caroteno e poder redutor; avaliar a ação antifúngica sobre o fungo *Penicillium expansum* e seu mecanismo de ação destes sobre as bactérias *Escherichia coli* (*E. coli*) e *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Óleos Essenciais

O metabolismo secundário das plantas é definido como um conjunto de reações que produzem compostos não essenciais para o crescimento e diferenciação dos indivíduos, mas que são extremamente importantes para sua proteção e defesa. Exemplos desses metabólitos incluem alcaloides, cumarinas, flavonoides e óleos essenciais. (Specian *et al.*, 2014)

Considerando a definição da International Standard Organization (ISO) (2021), os óleos essenciais são “produtos obtidos de matérias-primas naturais de origem vegetal, por destilação a vapor, por processos mecânicos a partir do epicarpo de frutos cítricos, ou por destilação a seco”.

Simões *et al.* (2017) salientam que os óleos essenciais são uma mistura complexa que podem ser chamados de óleos voláteis, etéreos ou essências. Tais denominações derivam-se de suas características físico-químicas, como a de serem geralmente líquidos de aparência oleosa, volatéis, comumente apresentarem aroma agradável e intenso e serem solúveis em solventes orgânicos apolares. Além dessas características, eles são normalmente incolores ou ligeiramente amarelados, com exceção dos óleos de camomila e mil-folhas, que apresentam altos teores de azulenos. Ressalta-se que os óleos essenciais são pouco estáveis na presença de luz, calor, umidade e metais.

A estrutura química dos constituintes dos óleos essenciais é formada basicamente por carbono, oxigênio e hidrogênio, variando em relação à função orgânica, como hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, entre outros. Os óleos essenciais podem conter aproximadamente entre 20-60 componentes em diferentes concentrações. Os que apresentam maior concentração são denominados compostos majoritários, os de menor proporção são denominados compostos minoritários e aqueles componentes em concentrações mínimas são conhecidos como traço.

OE's podem ser sintetizados por todos os órgãos das plantas, entre eles, botões florais, flores, folhas, caule, galhos finos, sementes, frutos, raízes e cascas, e são estocados em células secretoras, cavidades, canais, células epidérmicas ou tricomas glandulares (Bakkali *et al.*, 2008; Simões *et al.*, 2017).

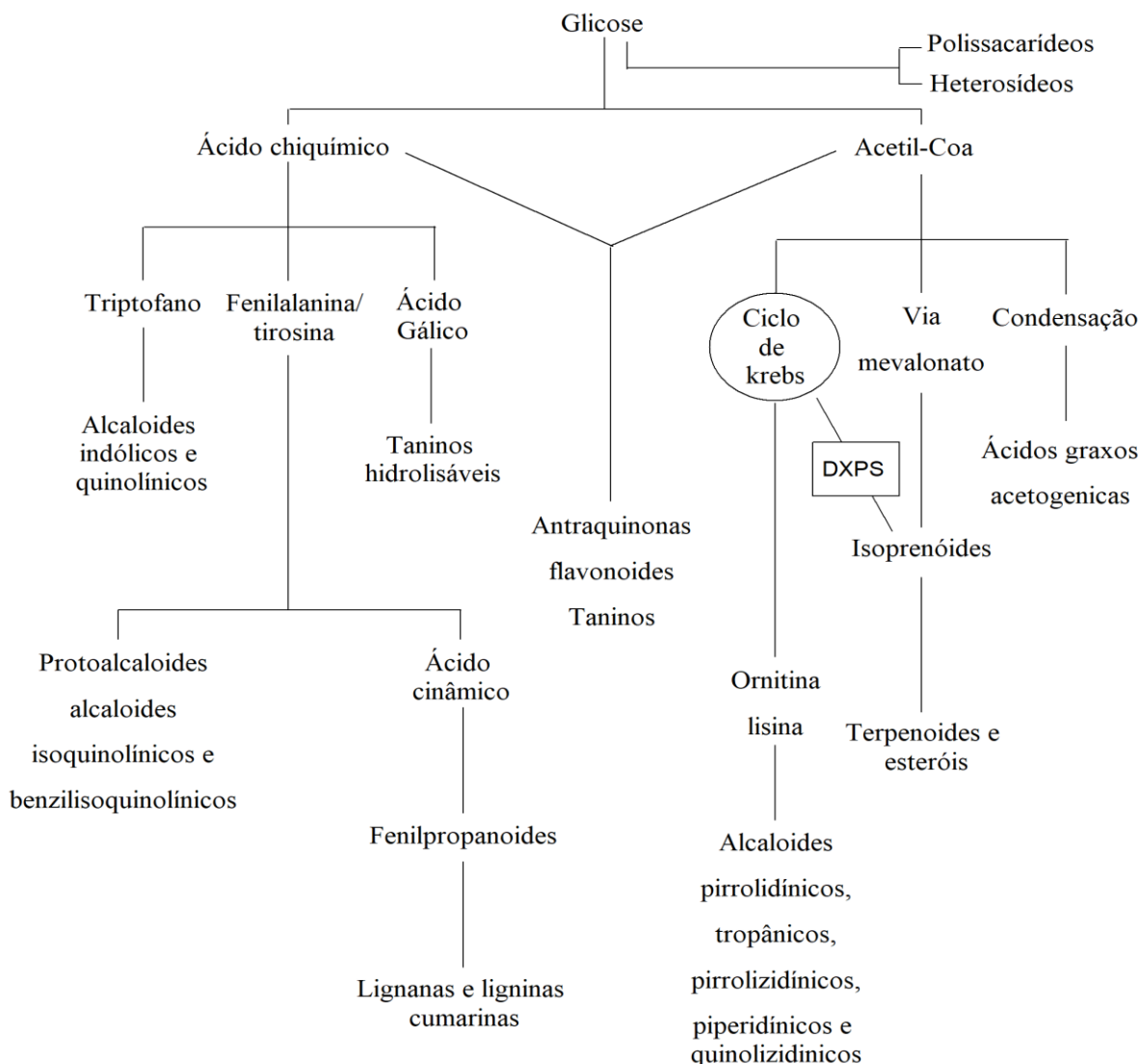
Os óleos essenciais possuem propriedades biológicas diversificadas, tendo a capacidade de atuar como agentes antioxidantes, inseticidas, alelopáticos, antissépticos, antimicrobianos, analgésicos, sedativos, anti-inflamatórios, espasmolíticos, dentre outros. Na natureza, os óleos essenciais desempenham um importante papel no sistema de defesa química das plantas diante a predadores (Bakkali *et al.*, 2008). Tendo essa relevância na natureza, os óleos essenciais estão sendo cada vez mais explorados pelos diferentes segmentos industriais, destacando-se na indústria alimentícia, na conservação e incremento de aroma e sabor dos alimentos, na indústria farmacêutica, por apresentarem propriedades farmacológicas; e na indústria de cosméticos, atuando como matéria-prima para sabonetes, cremes e perfumes (El Asbahani *et al.*, 2015).

Há diversos métodos para extração dos óleos essenciais, enfloração, forno micro-ondas, métodos que utilizam solventes orgânicos, extração de fluido supercrítico com CO₂, empregado na indústria, destilação por arraste a vapor d'água e hidrodestilação (Teixeira, 2013). Salienta-se que a hidrodestilação e o arraste a vapor são as técnicas mais empregadas e utilizadas em laboratório. Esses métodos compreendem em se obter o óleo essencial por meio da volatilização de seus constituintes químicos, que, em seguida, são condensados e coletados no aparelho de Clevenger modificado (Simões *et al.*, 2017).

2.1.1 Biossíntese dos Óleos Essenciais

Os óleos essenciais são constituídos, em sua maioria, por fenilpropanoides e terpenos, obtidos a partir do metabolismo da glicose (Figura 1). Os fenilpropanoides são sintetizados pela via do chiquimato e os terpenos, terpenoides e seus derivados pela via do acetato (rota do mevalonato ou do 5 – fosfato de 1 – deoxi – D – xilulose (DXPS)).

Figura 1 - Metabolismo da Glicose.

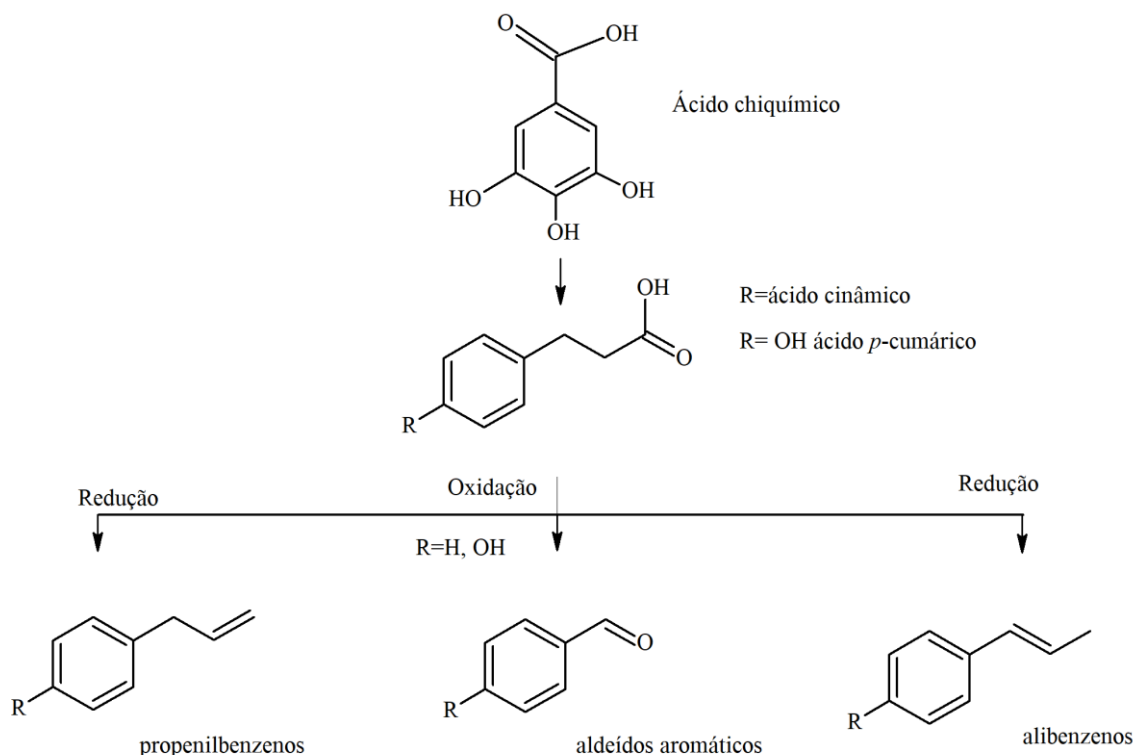


Fonte: Simões *et al* (2017).

Os fenilpropanoides são formados por meio do ácido chiquímico que, por sua vez, são originados da condensação aldólica de fosfoenopiruvato e eritrose-4-fosfato. Quando formado, o ácido chiquímico reage com uma molécula de fosfoenolpiruvato, gerando o ácido corísmico, que é responsável pela síntese de aminoácidos aromáticos (fenilalanina e a tirosina). Esses aminoácidos, por meio da perda de uma molécula de amônia, dão origem aos ácidos cinâmicos e *p*-cumárico, respectivamente. Os ácidos cinâmicos e *p*-cumárico, por sua vez, sofrem inúmeras reações de redução enzimática, formando propenilbenzenos e/ou alilbenzenos, que são oxidados com degradação das cadeias laterais e ciclização a fenilpropanoides (Dewick, 2008). A ilustração do mecanismo

simplificado da formação dos fenilpropanóides, por meio do ácido chiquímico, pode ser observada na Figura 2.

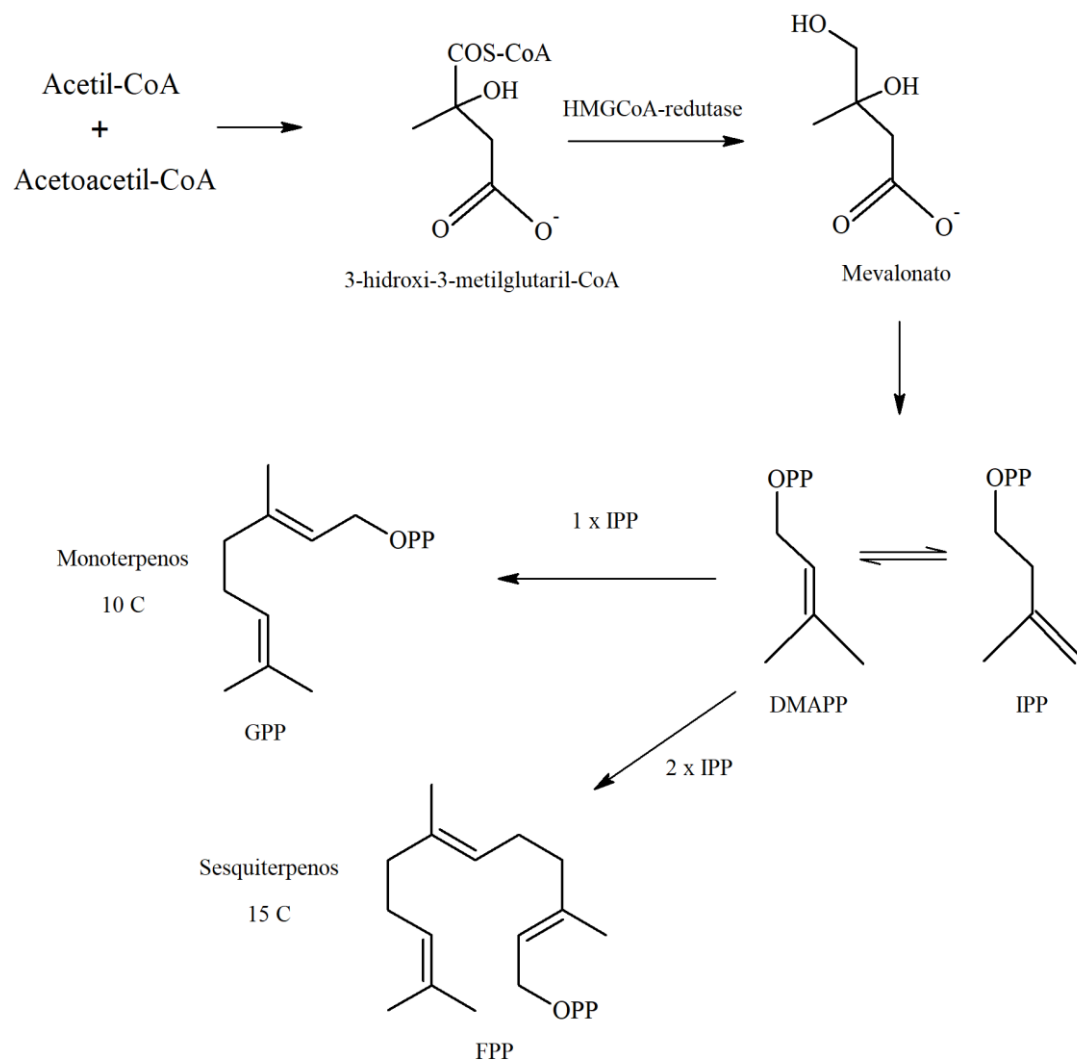
Figura 2 - Mecanismo simplificado da formação dos fenilpropanóides.



Fonte: Simões *et al.* (2017).

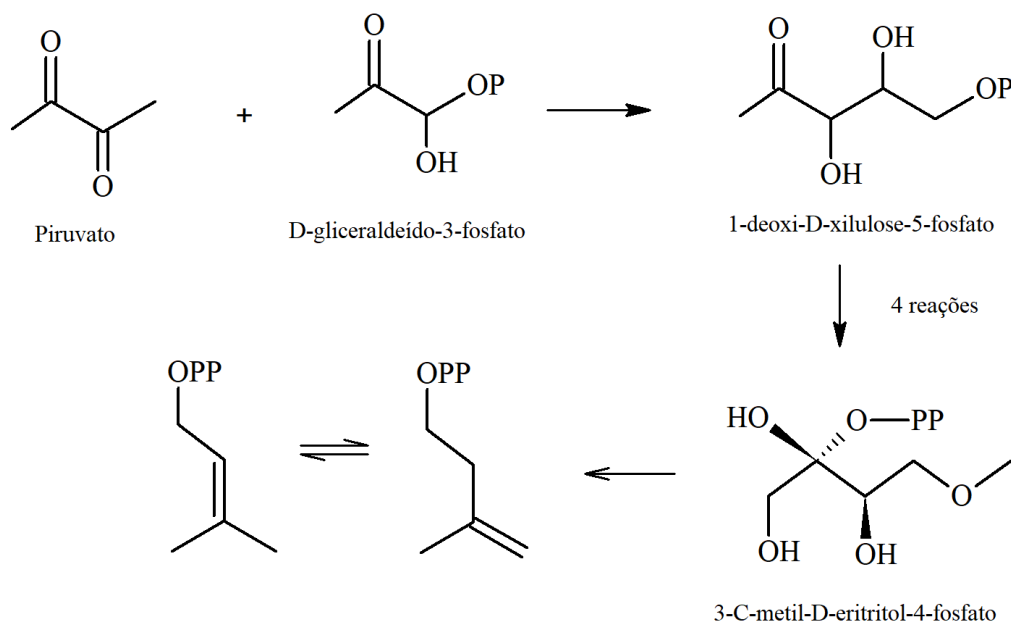
Os compostos terpênicos são biossintetizados a partir das moléculas fosforiladas e ativas isopentenil difosfato (IPP) e seu isômero dimetilalil difosfato (DMAPP). A síntese para a formação dos intermediários básicos (IPP e DMAPP) ocorre por meio de duas vias independentes localizadas em compartimentos intracelulares separados; no citosol, o IPP é formado por meio da via do mevalonato através da condensação do acetil-CoA (Figura 3) e, nos plastídios, formado por meio do piruvato e gliceraldeído 3-fosfato por meio do fosfato de metileritritol, seguindo a via do DXPS (Figura 4) (Simões *et al.*, 2017). Os terpenos são classificados pela quantidade de unidades isoprênicas; uma única unidade é conhecida como hemiterpenos; quando dois isoprenos se juntam ocorre a formação dos monoterpenos (10 átomos de carbonos); já a junção de três unidades isoprênicas origina os sesquiterpenos (15 átomos de carbonos), e assim por diante (Dewick, 2008).

Figura 3 - Biossíntese dos terpenos pela via do mevalonato.



Fonte: Adaptado de Simões *et al.* (2017).

Figura 4 - Biossíntese dos terpenos pela via do DXPS.



Fonte: Dewick (2008).

2.2 Espécies Vegetais

2.2.1. *Prunus persica* (pessegueiro)

A espécie *Prunus persica*, popularmente conhecida como pessegueiro (Figura 5), é uma árvore pertencente à família Rosaceae. Oriundo da China, Afeganistão e Irã, cultivado extensivamente como fruteira e encontrado ocasionalmente assilvestrado. A árvore atinge 6 metros de altura, apresentam folhas lanceoladas que aparecem depois das flores e geram frutos comestíveis denominados de “pêssego” (Novaes; Yamamoto; Marques, 2021).

O óleo de caroço de pêssego tem sido amplamente utilizado na indústria cosmética como ingrediente de sabonetes, xampus, loções e cremes, por ser um óleo leve, penetrante, de fácil absorção e não deixa sensação gordurosa. O óleo de caroço de pêssego é nutricionalmente atraente e tem a oportunidade de produzir produtos de alto valor a partir do biorresíduo na indústria de pêssego, devido aos seus ácidos graxos insaturados e constituintes antioxidantes (Wu *et al.*, 2011).

Figura 5 - Aspecto geral do pessegueiro.



Fonte: Ma (2009).

2.2.2. *Satureja montana* (segurelha)

A Segurelha é uma planta de origem mediterrânea, sua essência lembra a hortelã e o tomilho, embora mais apimentada. Sendo ideal para dar um sabor especial aos pratos. A *Satureja montana* é uma planta perene que pode atingir de 15 a 70 cm de altura, com pequenas flores brancas ou levemente rosadas. Suas folhas são mais estreitas e seu sabor é mais forte, sendo normalmente usada em pratos como sopas, peixes, carnes e em pratos à base de feijão. É uma planta aromática, tradicionalmente usada na península dos Balcãs como tempero e conservante natural de alimentos, também é muito utilizada para o tratamento de bronquite. O óleo essencial de segurelha apresenta uma vasta gama de propriedades como: antioxidantes, antibacterianas, antifúngicas, inseticida, dentre outras (Jman Redzic, 2006).

Figura 6 - Aspecto geral da segurelha.



Fonte: Kowalchik e Hylton (1997).

2.3 Atividade Antioxidante

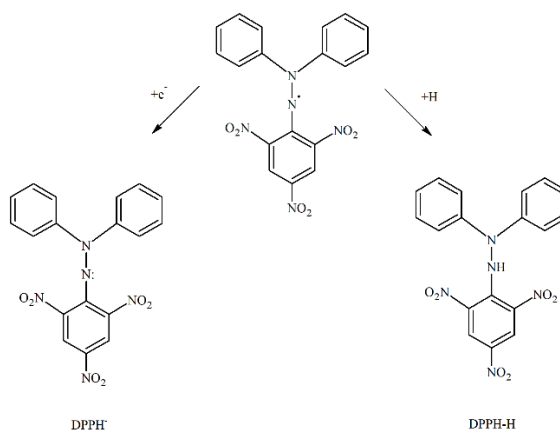
Os radicais livres são espécies químicas que apresentam um ou mais elétrons desemparelhados. São intermediários de reações químicas muito reativos. Esses, por sua vez, causam danos oxidativos nas células e tecidos, e estão relacionados com a citologia de várias doenças, tais como as degenerativas: o câncer, a aterosclerose e cardiopatias.

Quando existe um desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes, tem-se danos celulares, conhecido como estresse oxidativo. Dessa forma, a utilização de elementos antioxidantes na alimentação e em bebidas pode combater os radicais livres. Vários compostos presentes em plantas possuem essa atividade, como as vitaminas (α -tocoferol, β -caroteno, ácido ascórbico), clorofilina, curcumina, flavonoides e também alguns óleos essenciais (Prevedello; Comachio, 2021).

Dentre os métodos antioxidantes, destacam-se aqueles baseados na estabilização de radicais (ABTS, DPPH e hidroxil); complexação de metais (redução do molibdênio e poder redutor - FRAP) e inibição da peroxidação lipídica (TBARS, oxidação do LDL e cooxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico), lipossomas e acetilcolinesterase.

A avaliação antioxidante pelo método de sequestro DPPH consiste em avaliar a redução do radical estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazina (DPPH) a 1-1-difenil-2-picrilhidrazina, com perda de sua coloração púrpura como indicativo do potencial de antioxidante da espécie avaliada. A reação é monitorada espectrofotometricamente no comprimento de onda de 515 nm. A redução do DPPH corre pela transferência de elétrons por parte do composto antioxidante avaliado ou pela via de transferência de um átomo de hidrogênio (Figura 7) (Oliveira *et al.*, 2016).

Figura 7 - Mecanismo de redução de DPPH.



Fonte: Oliveira (2015).

De acordo com Duarte-Almeida (2006), o ensaio de branqueamento de β -caroteno avalia a capacidade da amostra ou composto em proteger o substrato lipídico (β -caroteno) da oxidação, o qual é avaliado por medidas espectrofotométricas da descoloração (oxidação) do β -caroteno, devido ao ataque de radicais resultantes da oxidação do ácido linoleico por espécies reativas de oxigênio que estavam presentes no meio. Quando não há substâncias antioxidantes no meio, ele perde sua coloração alaranjada.

Existem vários estudos sobre a atividade antioxidante dos óleos essenciais. Dentre eles, tem-se o de Kumar *et al.* (2019), que realizaram testes antioxidantes de espécies Asteraceae e Lamiaceae e obtiveram bons resultados. O óleo essencial de *N. ciliaris* apresentou atividade máxima de estabilização dos radicais livres DPPH e os óleos de *N. leucophylla*, *E. annuus* e *E. mucronatus* apresentaram capacidade antioxidante próxima ao BHT, seguido por *C. umbrosa*, *N. clarkei* e *E. karwinskianus*. Os autores destacam que os resultados promissores da atividade antioxidantes dos óleos essenciais dessas espécies estão relacionados aos compostos ativos, como fenilpropanoides e terpenoides, presentes nos óleos essenciais.

Ferreira *et al.* (2019) estudaram os óleos essenciais de hortelã, cravo-da-índia, orégano e candeia e verificaram que o óleo de cravo-da-índia e orégano, e seus constituintes majoritários eugenol e carvacrol, apresentaram atividade antioxidante frente aos ensaios colorimétricos de estabilização de radicais DPPH e hidroxila, proteção do sistema β -caroteno, além de se mostrarem potentes agentes redutores no ensaio de poder redutor. O óleo de hortelã teve efeito quelante frente aos íons ferro (II), e o óleo de candeia não apresentou atividade.

Gomes *et al.* (2017), avaliando efeitos de revestimentos comestíveis incorporados com óleos essenciais cítricos na qualidade de framboesas vermelhas, verificaram que, pelo teste de lipossomas, os revestimentos incorporados com os óleos de limão e laranja foram capazes de prevenir a peroxidação lipídica.

Andrade *et al.* (2012) estudaram os óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinal*, e verificaram que esses óleos essenciais apresentaram atividade antioxidante pelo teste de branqueamento β -caroteno; porém, pelo teste de DPPH, apenas *C. nardus* apresentou atividade antioxidante. Para os autores, isso ocorreu porque esse teste é impróprio para substâncias lipofílicas devido à baixa solubilidade do óleo nas condições de análise.

Miranda *et al.* (2014) estudaram a composição química dos óleos essenciais extraídos de folhas frescas de tomilho, capim-limão, alfavaca e manjeriço, e avaliaram a sua atividade antioxidante pelos métodos de sequestro de radicais DPPH e pela inibição da oxidação do sistema de branqueamento β -caroteno. A atividade dos óleos foi analisada em comparação à atividade dos padrões dos constituintes majoritários dos óleos essenciais das plantas em estudo, que foram: timol, citral, eugenol e linalol, respectivamente. Os autores encontraram resultados satisfatórios para as amostras de eugenol e do óleo essencial de alfavaca. Eles perceberam que os óleos essenciais e seus respectivos padrões se agrupam devido à similaridade quanto às quantidades de fenilpropanoides e monoterpenos.

Miranda *et al.* (2016), extraindo óleos essenciais das folhas frescas das espécies *C. bonariensis*, *P. hystrophorus*, *T. diversifolia*, *A. polystachya*, *H. coronarium* e de *B. dracunculifolia*, verificaram uma predominância de monoterpenoides nos óleos essenciais de *C. bonariensis*, *T. diversifolia*, *H. coronarium* e *B. dracunculifolia* e predominância de sesquiterpenoides nos óleos de *P. hystrophorus* e *A. polystachya*. Na avaliação do sequestro do radical DPPH, os óleos essenciais de todas as espécies não apresentaram atividade, e no teste de branqueamento β -caroteno, apenas os óleos essenciais de *C. bonariensis*, *P. hystrophorus*, *A. polystachya*, e *B. dracunculifolia* apresentaram IC₅₀ superiores à maior concentração avaliada (250 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Segundo os autores, os resultados não promissores podem ter sido pelo fato de os constituintes majoritários dos óleos avaliados, não serem compostos fenólicos ou que contêm átomos de hidrogênio na posição alílica e/ou posições benzílicas.

Ferreira *et al.* (2019) citam que alguns óleos essenciais não apresentam atividade frente aos testes DPPH e ensaio de branqueamento β -caroteno. Para os autores, isso é atribuído a vários fatores como a metodologia utilizada, a dificuldade de solubilização e a estrutura química dos constituintes dos óleos, em que o último é o fator que mais influencia na atividade antioxidante, pois a estrutura química do constituinte majoritário do óleo essencial está diretamente ligada à determinação da sua atividade.

2.4 Contaminação de Alimentos por Microrganismos

Os alimentos apresentam grande facilidade de contaminação por microrganismos durante sua manipulação e seu processamento, uma vez que são fontes de substâncias

nutritivas ideais para o crescimento de microrganismos, como fungos e bactérias. A Organização Mundial da Saúde (OMS) destacou, em 2020, que as Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) apresentam uma variedade de sintomas, desde gastroenterites leves (como diarreia, cólicas, náuseas, vômitos e febre) até síndromes neurológicas, hepáticas e renais. Essas doenças afetam cerca de 600 milhões de pessoas, ou quase 1 em cada 10 pessoas no mundo (Fung; Wang; Menon, 2018; Payal *et al.*, 2021).

As principais bactérias causadoras das DTAs são *Staphylococcus aureus*, *Cronobacter sakazakii*, *Bacillus cereus*, *Salmonella*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Shigella*, *Vibrio*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, entre outras. Alguns desses patógenos são formadores de esporos, tornando-os altamente resistentes ao calor, como *Clostridium*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus*. Existem também bactérias não formadoras de esporos, como *Brucella*, *Campylobacter*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Listeria* e *E. coli*, algumas produzem toxinas resistentes ao calor, como *Clostridium botulinum* e *Staphylococcus aureus*. A maioria dos patógenos são termofílicos, enquanto alguns patógenos de origem alimentar, como *Yersinia enterocolitica* e *Listeria monocytogenes*, são capazes de crescer em baixas temperaturas (Bintsis, 2017; Lorenzo *et al.*, 2018).

Prakash *et al.* (2018) trabalharam com aplicações de óleos essenciais para melhorar o prazo de validade de produtos frescos usando diferentes abordagens. Esses autores salientaram que a incorporação de óleos essenciais na matriz do filme, em vez da adição direta aos alimentos, ajudou a inibir patógenos e a formação de sabores e odores desagradáveis.

Brandão *et al.* (2023) estudaram a eficácia *in vitro* e *in vivo* de embalagens de nanofibras de poli(ácido láctico) contendo óleos essenciais de *Ocimum basilicum* L. e *Ocimum gratissimum* L. sobre *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus niger* em uvas de mesa e perceberam que os dois óleos protegeram significativamente as frutas da contaminação pelos fungos *A. carbonarius* e *A. niger* durante o armazenamento (*in vitro* e *in vivo*), bem como também reduziram a produção de ocratoxina A (*in vitro*), um metabólito secundário produzido pelos fungos que apresenta potencial cancerígeno.

Zhang *et al.* (2022) citam em seu trabalho que, quando o morango foi revestido com uma nanoemulsão de pululano com óleos essenciais de canela (OEC), houve inibição na decomposição dos frutos durante o armazenamento. Os autores observaram que as camadas de revestimento incorporadas com a nanoemulsão de OEC exibiram um efeito

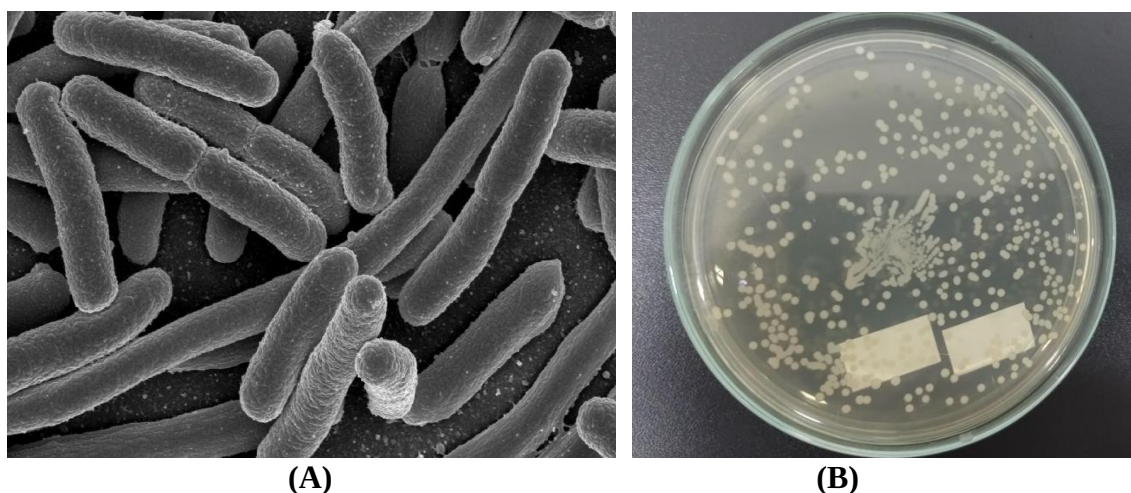
positivo na qualidade dos frutos de morango, incluindo perda de peso, percentual de atenuação, firmeza, teor de sólidos solúveis e ácido titulável, o que pode ser atribuído às fortes propriedades antibacterianas dos óleos essenciais de canela.

Brandão *et al.* (2022) citam que há métodos tradicionais de controle da contaminação fúngica que utilizam a preservação física e o uso de fungicidas químicos. Entretanto, existem problemas com esses tratamentos, uma vez que podem prejudicar os alimentos, deixando resíduos com sabor desagradável e toxicidade, apresentando efeitos biológicos indesejáveis à saúde humana, além de contribuir para o desenvolvimento de fungos resistentes a fungicidas.

2.4.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) (Figura 8 A e B) é uma bactéria Gram-negativa que apresenta forma de bastonete. A estrutura de sua parede celular possui uma fina camada de peptidoglicano e uma membrana externa que contém lipopolissacarídeos; é uma bactéria pertencente à família Enterobacteriaceae, sendo uma das mais estudadas e uma das mais comuns no trato gastrointestinal de humanos e animais. A faixa ótima de pH para o desenvolvimento de *E. coli* está entre 6 e 7, embora ela possa tolerar um pH entre 4 e 9. As cepas de *E. coli* suportam temperaturas de 7 a 46 °C, sendo a temperatura mais favorável para seu crescimento entre 35 e 40 °C (Batista, 2014).

Figura 8 - Aspecto geral da bactéria *Escherichia coli*.



Legenda: Imagem A: Micrografia eletrônica de varredura da bactéria *Escherichia coli*. Fonte: National Geographic Society (2023). Imagem B: Colônias de *Escherichia coli* em ágar Mueller-Hinton. Fonte: Do autor (2024).

A presença de *E. coli* em água ou alimentos indica contaminação fecal e condições inadequadas de higiene. Comumente, os alimentos associados a doenças transmitidas por essa bactéria incluem carnes, embutidos, como salsichas, leite cru, queijo, alface, melão, rabanete e água. Existem pelo menos cinco tipos de infecção intestinal causadas pela *E. coli*, são elas: enteropatogênica (EPEC), enterotoxigênica (ETEC), enteroinvasor (EIEC), enterohemorrágica (EHEC) e enteroaderente (EAEC). Os sintomas se diferem quanto a classe patogênica; porém, apresentam alguns sintomas comuns como diarreia, náuseas, vômitos e dor abdominal (Tavares, 2018).

As bactérias enterotoxigênicas são a causa mais comum de diarreia infantil e dos viajantes. A transmissão ocorre pela ingestão de alimentos ou água contaminada com dejetos humanos ou pelo contato de pessoa a pessoa. As enteropatogênicas são uma das principais causas de diarreia em crianças, particularmente em locais com condições sanitárias precárias. Já na bactéria entero-hemorrágica, ligam-se às células no intestino grosso, na qual produzem uma exotoxina (verotoxina ou toxina do tipo Shiga), e causa uma grave diarreia abundante e com sangue (colite hemorrágica). Esse tipo acomete com gravidade crianças e idosos. As enteroinvasivas causam uma síndrome tipo disenteria com febre e fezes sanguinolentas, principalmente, em jovens e adultos. As enteroaderentes causam a diarreia dos viajantes e a diarreia persistente em crianças pequenas (Batista (2014); Tavares, 2018).

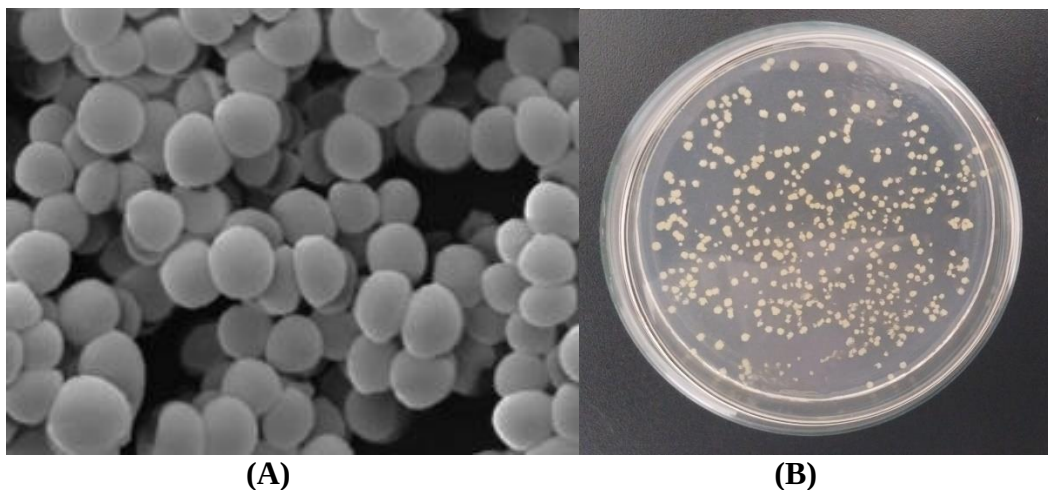
2.4.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) (Figura 9 A e B) é uma bactéria Gram-positiva, pertencente à família Micrococcaceae. Suas estruturas se apresentam em agregados semelhantes a cachos de uva, que não formam esporos. São microrganismos anaeróbios facultativos que se desenvolvem bem em uma faixa de pH entre 7 a 7,5, em temperaturas entre 7 e 47 °C. Salienta-se que *S. aureus* também se desenvolve em alimentos com pH entre 4,2 e 9,3 e em concentrações de sal de até 15%, ou seja, esses microrganismos apresentam uma certa resistência a determinadas concentrações de sal (Tavares, 2018).

As células Gram-positivas apresentam parede celular espessa, composta principalmente de peptidoglicano. Diferentemente das células Gram-negativas, as células Gram-positivas não apresentam uma membrana externa, tornando-as menos complexas estruturalmente. Na camada peptídica, os ácidos teicoicos estão covalentemente ligados

ao peptidoglicano, ao passo que os ácidos lipoteicoicos estão ancorados na membrana citoplasmática. Esses ácidos desempenham papéis importantes na estabilidade da parede celular e na regulação da autólise celular (Batista, 2014).

Figura 9 - Aspecto geral da bactéria *Staphylococcus aureus*.



Legenda: Imagem A: Micrografia eletrônica de varredura da bactéria *Staphylococcus aureus*.
Fonte: Clébis (2021).

Imagem B: Colônias de *Staphylococcus aureus* em ágar Mueller-Hinton.
Fonte: Do autor (2024).

2.4.3 *Penicillium expansum*

Penicillium expansum (Figura 10) é um fungo filamentosso pertencente ao gênero *Penicillium*. É comumente encontrado em solo, matéria orgânica e frutas em decomposição. Conhecido como um patógeno que causa a podridão-azul, especialmente em frutas armazenadas, como maçãs e peras. Causam danos na pós-colheita e apresenta alto potencial de produção de micotoxinas, que são prejudiciais à saúde humana e animal (Errampalli, 2014).

Uma das preocupações mais sérias relacionadas a *Penicillium expansum* é a produção de patulina, uma micotoxina que pode contaminar sucos de frutas, compotas e outros produtos alimentícios. A patulina é tóxica para humanos e animais, podendo causar efeitos adversos à saúde, como danos ao fígado e aos rins, além de apresentar potencial carcinogênico (Errampalli, 2014).

De acordo com Palmieri *et al.* (2022), *P. expansum* aumenta sua virulência ao modular localmente o pH do hospedeiro por meio da produção de ácidos orgânicos, principalmente cítrico e glucônico, além do efluxo de íons H^+ resultante da utilização de NH_4^+ . O acúmulo dessas espécies químicas no tecido da fruta em decomposição provoca

uma redução do pH entre 0,5 e 1,0 unidades, o que promove a atividade das enzimas poligalacturonases e a transcrição de genes relacionados à virulência fúngica.

Figura 10 - Aspecto geral do fungo *Penicillium expansum*.



Fonte: Do autor (2024).

2.5 Mecanismo de ação de óleos essenciais sobre bactérias

Tendo em vista que os óleos essenciais apresentam diversas atividades, dentre elas a antibacteriana, avaliar seu mecanismo de ação destes sobre bactérias é de grande relevância, uma vez que entender esses mecanismos pode ajudar a compreender seu funcionamento. Como os óleos essenciais são uma mistura complexa de compostos, pode haver efeitos sinérgicos, já que a combinação desses múltiplos compostos pode resultar em uma atividade antimicrobiana mais forte do que a soma das atividades individuais. Os óleos essenciais podem agir na parede celular, na integridade e na permeabilidade da membrana, causando vazamento de materiais citoplasmáticos.

Diao *et al.* (2014) mostraram que a perturbação da integridade da membrana plasmática que leva ao efluxo de DNA, RNA e proteínas, após o tratamento com OEs em bactérias, é um dos principais mecanismos de ação antimicrobiano. Os resultados do estudo mostraram a capacidade que o óleo essencial de sementes de erva-doce apresentou

em liberar constituintes celulares na faixa de 260 nm, sendo o trans-anetol o constituinte majoritário. Han, Sun e Chen. (2019) avaliaram o efeito do limoneno (20 mL L^{-1}) sobre *Listeria monocytogenes* e demonstraram o declínio acentuado nas concentrações de proteína celular e ácido nucleico entre 3 e 9 horas de tratamento, o que foi atribuído a desorganização na integridade da membrana plasmática, facilitando o vazamento dos principais materiais citoplasmáticos.

Zhang *et al.* (2016) investigaram os efeitos do óleo essencial de canela sobre os patógenos alimentares *E. coli* e *S. aureus*. Os autores observaram que uma dose máxima de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ de óleo de canela alterou significativamente a síntese dos principais componentes envolvidos na biogênese das paredes celulares bacterianas, conforme evidenciado por microscopia eletrônica de varredura. Além disso, os óleos essenciais desestabilizaram o potencial de membrana das células ao interromper a integridade e a permeabilidade da membrana plasmática. A desestabilização significativa da integridade e permeabilidade da membrana, com o consequente vazamento de íons celulares (Na^+ , H^+ e K^+) pela fumigação com óleo essencial, sugeriu a inativação de sistemas metabólicos vitais (respiração celular e síntese de ATP) nas células bacterianas.

Sokolik *et al.* (2018) demonstraram que o timol ($0,25 \text{ mg mL}^{-1}$) causa uma desorganização primária das frações lipídicas da membrana, resultando na desestabilização de sua permeabilidade. Embora a rota exata da atividade antibacteriana dos óleos essenciais não possa ser confirmada devido à ampla variedade de compostos presentes, estudos podem prever possíveis mecanismos de ação dos OEs sobre as bactérias.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Química Orgânica - Óleos Essenciais do Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras (DQI – UFLA), na Unidade de Recursos Microbiológicos – Urmicro e no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME) da Universidade Federal de Lavras.

3.1 Obtenção do Material Vegetal

A espécie vegetal pessegueiro foi adquirida no câmpus da Universidade Federal de Lavras – UFLA, enquanto a segurelha foi obtida comercialmente em uma loja de produtos naturais situada em São Paulo – SP.

3.2 Extração do Óleo Essencial

Os óleos essenciais de segurelha e do pessegueiro foram obtidos por hidrodestilação, utilizando um aparelho de Clevenger modificado acoplado a um balão de fundo redondo de 5000 mL, de acordo com a metodologia descrita por Brasil (2010).

Em balão de fundo redondo com 2500 mL de água, foram adicionados 200 g do material vegetal das espécies vegetais em estudo. O processo de destilação ocorreu por um período de 2 horas para a obtenção do hidrolato. Decorrido esse tempo, o óleo essencial foi separado do hidrolato por centrifugação utilizando uma centrífuga de cruzeta horizontal (FANEM, 206-R) a 9,6 G por 15 min. O óleo foi retirado com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, acondicionado em frasco de vidro, e armazenado ao abrigo de luz e calor. O processo de extração foi realizado em triplicata.

3.3 Determinação da Umidade e do Rendimento do Óleo Essencial

A umidade de cada material vegetal foi determinada utilizando o sistema de Dean e Stark, que se baseia no princípio da imiscibilidade de solventes (cicloexano e água). Foram pesados cerca de 5 g de material vegetal, juntamente com 80 mL de cicloexano. Após 2 horas de refluxo, o volume de água presente no material vegetal foi quantificado. A determinação da umidade foi realizada em triplicata, seguindo a metodologia descrita

por Pimentel *et al.* (2006). O rendimento da extração do óleo essencial de cada planta foi determinado em porcentagem de massa/massa (%m/m) em Base Livre de Umidade (BLU).

3.4 Caracterização Química dos Óleos Essenciais

A caracterização e quantificação química dos óleos essenciais foram realizadas no Centro de Análises e Prospecção Química – CAPQ, no Departamento de Química da UFLA. Os constituintes químicos dos óleos essenciais foram identificados por cromatografia em fase gasosa, acoplada à espectrometria de massas (CG/EM- Shimadzu, QP5050A) utilizando-se uma coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm) com fase ligada a DB5 (0,25 μm de espessura). O gás de arraste que foi utilizado é o hélio a um fluxo de 1,18 mL min⁻¹ a 210 °C. A temperatura iniciou em 60 °C, seguida de um aumento de 3 °C min⁻¹ até 240 °C; posteriormente, a 10 °C min⁻¹, até chegar em 300 °C, a qual permaneceu constante por 7 min. A temperatura do injetor foi de 220 °C e a do detector (ou interface) de 240 °C. Foi injetado 0,1 μL de amostra, diluída em hexano a uma taxa de partição de 1:100. Na avaliação quantitativa, utilizou-se um cromatógrafo gasoso (Shimadzu CG – 17A) equipado com detector por ionização de chamas (FID). Os parâmetros experimentais de análise foram os mesmos utilizados na identificação por CG/EM, com temperatura do detector de 300 °C. Os constituintes foram identificados comparando os índices de retenção calculados pela equação de Van Den Dool e Kratz (1963), levando em consideração a relação da série homóloga de alcanos ($n\text{C}_8$ - $n\text{C}_{18}$) e com extrapolação para C_{19} e C_{20} , com os índices de retenção da literatura, segundo Adams (2017) e duas bibliotecas do equipamento NIST107 e NIST2. Essas bibliotecas possibilitaram a comparação dos espectros obtidos com os existentes.

3.5 Atividade Antioxidante: Diluição das Amostras

Nos testes antioxidantes de sequestro de radicais DPPH, branqueamento de β -caroteno e poder redutor, os óleos essenciais de segurelha e pessegueiro foram diluídos em etanol nas concentrações de 25; 50; 100; 150; 200; 250 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

3.5.1 Atividade Antioxidante: Sequestro de Radicais Livres DPPH

A avaliação do sequestro de radicais livres DPPH foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Teixeira *et al.* (2013), com algumas adaptações. Inicialmente, ocorreu a preparação de uma solução etanólica de DPPH, na concentração de 40 mg L⁻¹, que foi mantida ao abrigo de luz para evitar a degradação. Posteriormente, para a preparação da solução de DPPH, foram adicionados aos tubos de ensaio 0,3 mL de amostra, nas concentrações de 25; 50; 100; 150; 200; 250 e 500 µg mL⁻¹, seguido da adição de 2,7 mL da solução de DPPH. Paralelamente, foram preparados o controle pela adição de 0,3 mL de etanol e 2,7 mL de solução de DPPH. As misturas foram mantidas ao abrigo de luz por 60 min. Após esse período, foram realizadas leituras de absorbância em espectrofotômetro UV/ Vis a 515 nm.

A porcentagem de atividade antioxidante (% AA) foi calculada seguindo a Equação 2:

$$\% AA = 1 - \frac{A_{amostra}}{A_{controle}} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Em que:

$A_{amostra}$ = absorbância da solução contendo todos os reagentes

$A_{controle}$ = absorbância do controle.

O IC₅₀ (concentração mínima inibitória necessária para estabilizar 50% dos radicais DPPH) foi determinado pela equação da curva de %AA *versus* concentração.

O antioxidante sintético hidroxitolueno butilado (BHT) foi usado como padrão de comparação, e as análises foram realizadas em três repetições.

3.5.2 Atividade Antioxidante: Ensaio de Branqueamento β -caroteno

O ensaio de branqueamento β -caroteno foi realizado seguindo a metodologia de Kulisic *et al.* (2004), com algumas adaptações. Em um balão de fundo redondo com volume de 250 mL, houve a preparação de uma emulsão com 0,0030 g de β -caroteno, 0,2000 g de ácido linoleico, 1,000 g de Tween 20 e 15 mL de clorofórmio. Posteriormente ao preparo dessa emulsão, ela foi rota-evaporada por 60 min a 50 °C, para eliminação do

clorofórmio. Ao resíduo, foram adicionados 500 mL de água destilada saturada em oxigênio.

O ensaio foi realizado com quatro repetições, no qual foram adicionados aos tubos de ensaio 2,7 mL da emulsão e 0,3 mL dos óleos essenciais nas concentrações de 25; 50; 100; 150; 200; 250; 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Simultaneamente, foi preparado o controle, composto por 0,3 mL de etanol e 2,7 mL de solução de β -caroteno. Posteriormente, foram realizadas leituras em espectrofotômetro UV/Vis a 470 nm no tempo inicial ($t = 0$) e, após 60 minutos de incubação, a 50 °C na ausência de luz. Após todos os resultados da absorbância a porcentagem de atividade antioxidante (% AA), foi calculada seguindo a Equação 3:

$$\% AA = \left(1 - \frac{(A_0 - A_t)}{(A_{00} - A_{0t})} \right) \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Em que:

A_0 : absorbância no início da incubação, com a amostra;

A_t : absorbância depois de 60 minutos, com amostra;

A_{00} : absorbância no início da incubação, sem a amostra;

A_{0t} : absorbância depois de 60 minutos, sem amostra.

O IC_{50} foi determinado pela da equação da curva de %AA *versus* concentração.

O antioxidante sintético BHT foi tomado como padrão de comparação.

3.5.3 Atividade Antioxidante: Método do Poder Redutor

A determinação do poder redutor dos óleos essenciais foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Ferreira *et al.* (2019). Inicialmente foram adicionados aos tubos de ensaio 50 μL de amostra nas concentrações de 25; 50; 100; 150; 200; 250 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 500 μL de solução tampão fosfato 0,01 mol L^{-1} (pH 7,4) e 500 μL de hexacianoferrato III de potássio 0,03 mol L^{-1} . Em seguida, essa mistura foi agitada em agitador Vortex (Phoenix/AP-56) e incubada a 50 °C por 20 min. Posteriormente à incubação, foram adicionado 500 μL de TCA 0,612 mol L^{-1} (ácido tricloroacético), 1500 μL de água destilada e 300 μL de FeCl_3 0,006 mol L^{-1} . Em seguida, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV/Vis a 700 nm. Para a determinação do poder redutor,

foram construídas curvas de absorvância *versus* concentração da amostra, tendo o ácido ascórbico como controle das análises, que foram realizadas em triplicata.

3.6 Atividade Antifúngica - Diluição das Amostras

Nos testes antifúngicos, os óleos essenciais de folhas de pêssogo e segurelha foram diluídos em DMSO, nas proporções de 1:1; 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64 e 1:128, resultando em concentrações de 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78; 0,39 e 0,19 $\mu\text{L mL}^{-1}$. A espécie fúngica *Penicillium expansum* (URMICRO – 10731) foi adquirida da Coleção de Cultura de Microrganismos do Departamento de Ciência dos Alimentos da UFLA. O inóculo do fungo foi incubado em placas de Petri contendo meio Agar Extract Malt a 25 °C por sete dias.

3.6.1 Atividade Antifúngica: Método Difusão em Disco

Para a determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI), foi realizado o teste de difusão em disco aceito pelo Food and Drug Administration e estabelecido pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003). Inicialmente após o período de sete dias, a suspensão de esporos dos fungos em água destilada estéril contendo 1% de Tween 80 foi preparada e para determinar as concentrações de esporos (10^7 esporos mL^{-1}), utilizou-se a câmara de Newbauer. Posteriormente, um volume de 100 μL da solução de esporos foi transferida para a placa contendo o meio de cultura pela técnica de espalhamento em superfície. Em seguida, discos estéreis de papel filtro de 5 mm de diâmetro, embebidos com 10 μL dos óleos diluídos em DMSO, nas concentrações definidas, foram posicionados sobre o meio de cultura. Como controle negativo, foi utilizado DMSO e, como controle positivo o fluodioxonil (2 $\mu\text{L mL}^{-1}$). As placas foram incubadas em Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD), a 25 °C, por 7 dias. Após esse período, realizaram-se as medições diametralmente opostas dos halos de inibição formados. Definindo, assim, a menor concentração de óleo essencial que apresentou um halo de inibição. O teste foi realizado em triplicata (NCCLS, 2003a).

3.7 Atividade Antibacteriana – Diluição das Amostras

As amostras foram diluídas de forma seriada para a realização dos testes, resultando em concentrações de 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78; 0,39 e 0,19 $\mu\text{L mL}^{-1}$.

3.7.1 Atividade Antibacteriana – Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e da Concentração Mínima Bactericida (CMB)

As cepas bacterianas das espécies *Escherichia coli* (EPEC – 055:H7) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 13565) foram ativadas em caldo BHI (caldo-infusão cérebro coração) e incubadas a 37 ° C em BOD por 24 horas, obtendo, assim as “culturas-mãe”. Posteriormente, para a realização dos testes, ajustou-se a turbidez dessas “culturas-mãe”; nas quais foram diluídas uma alíquota dessas em caldo de soja tríptica (TSB) e com o auxílio de um espectrofotômetro (Specord 200 Plus, Analytik Jena AG Germany) no comprimento de onda de 625 nm. As absorvâncias foram ajustadas para o intervalo entre 0,08 e 0,1, equivalente à concentração de 10^8 UFC mL^{-1} . Para a realização dos testes subsequentes, 1 mL do inóculo padronizado em 10^8 UFC mL^{-1} foi diluído em 9 mL de caldo TSB, resultando na concentração de 10^7 UFC mL^{-1} .

A CMI foi determinada pelo teste de macrodiluição em caldo, na qual foram adicionados em microtubos estéreis 850 μL de caldo Mueller-Hinton, 100 μL de suspensão bacteriana (10^7 UFC mL^{-1}) e 50 μL das diluições dos óleos essenciais. Como controle bacteriano, foram adicionados em tubos de ensaio 900 μL de caldo Mueller-Hinton e 100 μL de suspensão bacteriana. Para fins de comparação, foi preparado um controle positivo, no qual as diluições dos óleos essenciais foram substituídas pelo antibiótico Cloranfenicol. Como controle negativo, foi usado o DMSO no lugar das diluições. Homogeneizaram-se as soluções em agitador tipo Vórtex e elas foram incubadas a 37 °C em BOD por 24 horas. As concentrações que apresentaram ausência de turbidez foram definidas como CMI. Todos os testes foram realizados em triplicata (NCCLS, 2003b).

Para determinar a CMB, realizou-se o método de espalhamento em superfície, no qual foram plaqueados 4CMI, 2CMI, CMI, $\frac{1}{2}$ CMI e $\frac{1}{4}$ CMI. Estas foram incubadas a 37 °C em BOD por 24 horas. A menor concentração que apresentou ausência completa de crescimento bacteriano foi definida como CMB (NCCLS, 1999).

3.7.2 Atividade Antibacteriana – Teste de liberação de Íons Potássio

A concentração de íons potássio livres em solução foi analisada utilizando a metodologia de Camargo *et al.* (2020), com adaptações. Para esse teste, utilizou-se o kit semiquantitativo Cálcio/Potássio (Quantofix, Mecherey-Nagel, GmbH & Co., Alemanha), de acordo com as instruções descritas pelo fabricante.

Inicialmente, adicionaram-se 850 µL de caldo Mueller-Hinton, 100 µL de inóculo (10^7 UFC mL⁻¹) e 50 µL das CMI dos óleos essenciais obtidas para cada bactéria em microtubos estéreis. Como controle bacteriano e para fins de comparação, foram adicionados aos microtubos 900 µL de caldo Mueller-Hinton e 100 µL de inóculo (10^7 UFC mL⁻¹). As suspensões resultantes foram homogeneizadas, e alíquotas de 200 µL foram coletadas a cada 2 horas, para a realização das medições de íons potássio. 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 h.

3.7.3 Atividade Antibacteriana – Teste de Liberação de Constituintes Celulares

A liberação de constituintes celulares absorventes em 260 nm, foi determinada empregando a metodologia descrita por Yang, Khan e Kang (2015), com algumas modificações. A princípio em tubos de ensaio com tampa foram adicionados 3,5 mL de água peptonada (0,1%), 400 µL de inóculo 10^7 UFC mL⁻¹ e 100 µL da diluição dos óleos essenciais em DMSO, equivalentes a CMI. A liberação espontânea de conteúdos celulares por *E. coli* e *S. aureus* foi verificada utilizando 3,6 mL de água peptonada (0,1%) e 400 µL de inóculo 10^7 UFC mL⁻¹. Homogeneizaram e incubaram as soluções em BOD a 37 °C. Para a realização das leituras de absorbância nos intervalos de tempo de 0, 1, 2, 3, 4 e 5 horas, empregando espectrofotômetro (Specord 200 Plus, Analytik Jena AG Germany) na faixa de 260 nm, foram coletadas alíquotas do tratamento e elas foram diluídas em água peptonada (0,1%). As análises foram realizadas com quatro repetições.

3.7.4 Atividade Antibacteriana – Teste da Permeabilidade da Membrana

A porcentagem de absorção de cristal violeta pelas bactérias foi determinada conforme a metodologia descrita por Nogueira *et al.* (2021). Inicialmente, os microrganismos foram inoculados em caldo BHI e incubados em BOD por 24 h 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 com 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 da diluição de óleo essencial na 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 mL de solução de cristal violeta/PBS 10 µg mL⁻¹ 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 apenas o tampão fosfato e o microrganismo. Para a realização das leituras, utilizou-se um espectrofotômetro (Specord 200 Plus, Analytik Jena AG Germany) no comprimento de onda de 590 nm. 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 100% de cristal violeta (CV) livre. O experimento foi realizado em quatro repetições.

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

$$\% CV \text{ livre} = \frac{100 \times \text{Absorbância da amostra}}{\text{Absorbância da solução de cristal violeta}} \quad \text{Equação 4}$$

A partir dos resultados obtidos na Equação 1, calculou-se a porcentagem de cristal violeta absorvida, conforme a Equação 5.

$$\% CV \text{ livre} = 100 - \% CV \text{ absorvida} \quad \text{Equação 5}$$

3.7.5 Atividade Antibacteriana – Teste da Capacidade de Tolerância a Sal

A capacidade de tolerância de sal pelas bactérias em estudo foi avaliada de acordo com a metodologia descrita por Camargo *et al.* (2020).

A princípio, em microtubos estéreis, foram adicionados 850 µL de caldo Mueller-Hinton, 100 µL de inóculo 10^7 UFC mL⁻¹ e 50 µL das diluições dos óleos essenciais nas CMI's definidas. As suspensões obtidas foram diluídas em água peptonada (1%), nas proporções de 10x, 100x, 1000x e 10000x, uma alíquota de 100µL de cada diluição foi plaqueada em ágar Mueller-Hinton suplementado com 0%, 2,5% e 5% de NaCl. As placas foram envoltas com plástico-filme e incubadas em BOD a 37° C, por um período de 24 horas. As cepas bacterianas, sem o tratamento, foram usadas como fins de comparação, nos quais foram adicionados a microtubos 900 µL de caldo Mueller-Hinton e 100 µL de inóculo 10^7 UFC mL⁻¹, seguindo, depois o mesmo padrão dos tratamentos. Decorrente o período de incubação, foi definido o número de unidades formadoras de colônias em (UFC mL⁻¹), os quais foram convertidos em log (UFC mL⁻¹). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3.7.6 Atividade Antibacteriana – Avaliação da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O efeito dos óleos essenciais na morfologia das bactérias foi avaliado por Microscopia Eletrônica de Varredura. As amostras foram coletadas do plaqueamento em ágar Mueller-Hinton, para determinação da CMB. As amostras do controle bacteriano foram coletadas das placas sem adição das diluições dos óleos essenciais.

Quando coletadas, as amostras foram fixadas em solução de Karnovsky modificada (glutaraldeído 2,5%, formaldeído 2%, CaCl₂ 0,001 mol/L e tampão cacodilato 0,05 mol/L, pH 7,2 (Sigma-Aldrich). Posteriormente, as amostras foram lavadas com tampão cacodilato de sódio (0,05 M, pH 7,2) por um período de 10 min e desidratadas por exposição sequencial a 25, 50, 75, 90 e 100% de acetona por 10 min cada uma. As amostras foram secas em aparelho de ponto crítico (Bal-tec CPD 030 Balzers, Liechtenstein) e pulverizadas com ouro (Bal-tec modelo SCD 050 Balzers, Liechtenstein; De Oliveira *et al.* 2017). As eletromicrografias foram obtidas utilizando um microscópio eletrônico de varredura (LeoEVO 40XVP-Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

3.8 Análise Estatística

O delineamento experimental para os testes antioxidantes e biológicos realizados foram inteiramente casualizado, utilizando o programa Sisvar para comparação das médias por meio do teste Scott-Knott (Ferreira *et al.*, 2011).

As médias da atividade antioxidante para os óleos essenciais foram comparadas pelo teste Scott-Knott, com 5% de significância, em um esquema fatorial (3 x 7), sendo duas amostras de óleos essenciais (segurelha e folhas de pêssego e um controle, o BHT) e sete concentrações (25; 50; 100; 150; 200; 250 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$), com três repetições. Para os testes biológicos, liberação de constituintes celulares, cristal violeta e tolerância a sal, empregou-se o teste Scott-Knott, com 5% de significância.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Rendimento e Umidade

Os resultados obtidos para o teor de umidade (%) e rendimento em base livre de umidade (%p/p BLU) dos óleos essenciais em estudo, estão apresentados na Tabela 1:

Tabela 1 – Rendimento dos óleos essenciais em base livre de umidade.

Óleo Essencial	Teor de umidade (%)	Rendimento (%p/p BLU)
Segurelha	5,63 ± 0,16	0,39 ± 0,03
Folhas de pêssego	59,35 ± 0,10	0,14 ± 0,6

Fonte: Do autor (2024).

Os resultados obtidos para o rendimento de segurelha (0,39%), difere-se daqueles encontrados por De Oliveira *et al.* (2012), que obtiveram um valor de (0,47%). Rezende *et al.* (2021), ao estudarem o efeito dos óleos essenciais de *Satureja montana* L., *Myristica fragrans* H. e *Cymbopogon flexuosus* S., nas propriedades antifúngicas dos óleos essenciais de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus ochraceus*, obtiveram um rendimento de (0,47%), resultado que corrobora com os encontrados por De Oliveira *et al.* (2012).

Verma *et al.* (2017) estudaram o rendimento do óleo essencial de *Prunus persica* em diferentes épocas climáticas e verificaram que o rendimento foi maior em condições chuvosas (0,46 ± 0,05 g/100 g de folhas frescas), seguido pelo outono (0,45 ± 0,01 g/100 g de folhas frescas) e verão (0,42 ± 0,02 g/100 g de folhas frescas), obtendo rendimentos menores na primavera (0,14 ± 0,02 g/100 g de folhas frescas) e inverno (0,05 ± 0,02 g/100 g de folhas frescas). O resultado de rendimento do óleo essencial do presente estudo, corroboram com os obtidos por Verma *et al.* (2017) na primavera.

Afirmando o que foi citado por Gobbo-Neto; Lopes (2007), o qual destacam que o rendimento do óleo essencial varia, e esse fato pode estar relacionado à capacidade genética de uma planta em produzir ou não metabólitos secundários. Também podem ser atribuídas as diferenças na época de colheita, tipo de solo, clima da região, tempo de secagem e umidade relativa do ar no dia da colheita.

4.2 Caracterização Química

Os resultados obtidos para caracterização química das espécies em estudos estão apresentados nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2 - Composição química do óleo essencial de segurelha.

Pico	Composto	TR (min)	IR _{cal}	IR _{tab}	% Área
1	Canfeno	6.882	950	954	0,39
2	Octen-3-ol	7.663	976	979	0,79
3	Mirceno	7.982	987	990	0,13
4	Terpinoleno	8.994	1017	1088	0,17
5	<i>p</i>-Cimeno	9.270	1032	1024	22,46
6	1,8-Cineol	9.565	1032	1031	0,56
7	γ -Terpineno	10.520	1057	1059	0,57
8	Linalool	12.109	1099	1096	1,50
9	Cânfora	14.168	1147	1146	0,18
10	Borneol	15.241	1172	1169	0,88
11	Terpinen-4-ol	15.591	1180	1177	0,14
12	Anisol	18.085	1229	1235	1,08
13	Carvacrol	20.762	1299	1299	37,36
14	Óxido de cariofileno	32.430	1582	1583	1,07
15	1-Tetradecanol	36.005	1676	1672	3,45
16	Farnesol	43.181	1880	1875	2,76

Legenda: TR – tempo de retenção; IR_{cal} – Índice de retenção calculado; IR_{tab} – Índice de retenção tabelado.

Fonte: Do autor (2024).

Os principais componentes do óleo essencial de segurelha foram carvacrol e *p*-cimeno. Rezende *et al.* (2022) obtiveram como componentes principais borneol (36,18%), γ -terpineol (12,66%), carvacrol (11,07%) e *p*-cimeno (9,57%), compostos também encontrados neste estudo; porém, em menores porcentagens de área.

De Oliveira *et al.* (2011) identificaram timol (28,99%), *p*-cimeno (12,00%), linalol (11,00%) e carvacrol (10,71%) como os principais constituintes do óleo essencial de *S. montana* L. Enquanto Vitanza *et al.* (2019) encontraram carvacrol (43,9%), timol

(7,6%), éter metílico do timol (4,3%), borneol (3,1%) e cariofileno (3,4%) como os principais componentes do óleo essencial de *S. montana* L. Nemati *et al.* (2018), estudaram a composição química e atividade antioxidante de *S. montana* e encontraram como principais constituintes carvacrol (83,4%), éter metílico de timol (1,12%), p-terpineno (9,62%) e α -terpineno (1,70%).

Observa-se que os compostos encontrados para o óleo de segurelha são bem similares, mas variam quanto à quantidade. Esse fato pode estar relacionado à capacidade genética de uma planta em produzir ou não metabólitos secundários. Também podem ser atribuídas as diferenças na época de colheita, tipo de solo, clima da região, tempo de secagem e umidade relativa do ar no dia da colheita (Gobbo-Neto; Lopes, 2007).

Tabela 3 - Composição química do óleo essencial de folhas de pêssego.

Pico	Composto	TR (min)	IR _{cal}	IR _{tab}	% Área
1	Benzaldeído	7.250	960	962	100

Legenda: TR – tempo de retenção; IR_{cal} – Índice de retenção calculado; IR_{tab} – Índice de retenção tabelado.

Fonte: Do autor (2024).

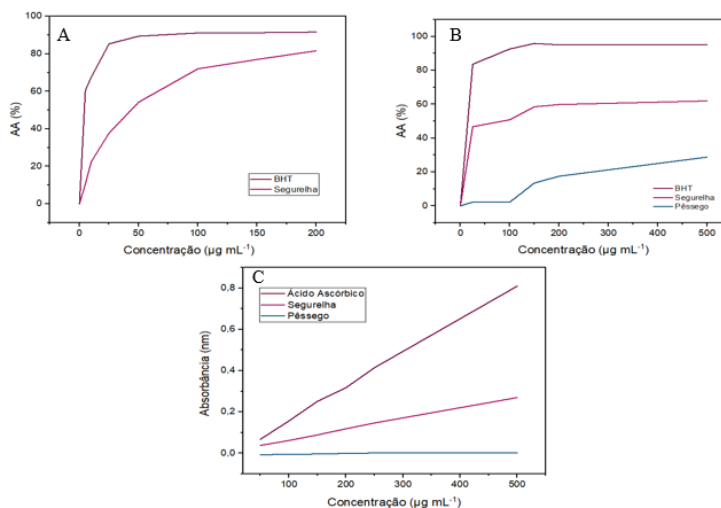
No óleo essencial de folhas de pêssego, encontrou-se apenas o benzaldeído. Verma *et al.* (2017) estudaram o rendimento do óleo essencial de *Prunus persica* em diferentes épocas do ano e verificaram um maior rendimento de óleo essencial e benzaldeído em condições chuvosas (0,45 g/100 g de folhas frescas) e outono (0,44 g/100 g de folhas frescas). Eles salientam que benzaldeído é predominante em óleos essenciais do gênero *Prunus*, dados que corroboram com aqueles encontrados neste trabalho.

O benzaldeído é um dos aldeídos aromáticos mais significativos, amplamente utilizado na indústria de perfumaria e no processamento de pigmentos, sendo o benzaldeído natural um material essencial para a produção de agentes aromatizantes alimentares, além de ser fundamental na preparação de corantes industriais e especiarias.

4.3 Testes Antioxidantes

Os dados das atividades antioxidantes dos óleos essenciais em estudo estão apresentados nos gráficos da Figura 13, os quais apresentaram um comportamento efeito dose dependente e crescimento exponencial.

Figura 13 - Potencial antioxidante dos óleos essenciais avaliados pelos ensaios de (A) Estabilização de radicais DPPH, (B) Branqueamento de β -caroteno e (C) Poder redutor.



Fonte: Do autor (2024).

Os valores IC₅₀ estão apresentados na Tabela 13, o óleo essencial de segurelha apresentou um melhor desempenho ao teste de DPPH, quando comparado com o teste branqueamento β -caroteno, uma vez que foi eficaz em todos os testes. O óleo essencial de folhas de pêssego não apresentou bom desempenho antioxidante em nenhum dos testes avaliados. Esses resultados estão ligados aos constituintes dos óleos essenciais em estudo, uma vez que a reatividade dos constituintes de óleos essenciais em reações de estabilização de radicais por doação de elétrons ou átomo de hidrogênio segue a seguinte ordem: fenilpropanoides, terpenoides com características fenólicas, álcoois e terpenos (mono e sesquiterpenos hidrocarbonetos) (Teixeira *et al.*, 2014). Como o carvacrol é um monoterpene fenólico, os óleos que apresentam esse constituinte em sua composição apresentam uma ótima atividade, bem como no caso da segurelha.

Tabela 4 - Porcentagem de atividade antioxidante dos óleos essenciais.

Amostra	IC ₅₀ µg mL ⁻¹	
	DPPH	β-caroteno
BHT	3,35 ± 1,46 ^a	7,04 ± 2,34 ^a
Segurelha	42,24 ± 0,66 ^b	62,74 ± 7,54 ^b
Folhas de pêssego	NA	> 500 ^c

Legenda: As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste Scott-knott, ao nível de 5% de probabilidade. NA - não apresentou atividade.

Fonte: Do autor (2024)

Entretanto, o óleo essencial de folhas de pêssego apresenta somente benzaldeído em sua composição, por não ser um composto fenólico; isso explicaria sua baixa atividade antioxidante, pois bons antioxidantes devem ser capazes de doar átomos de hidrogênio ou elétrons e serem estabilizados pelos efeitos de estruturas hiperconjugativas e de ressonância (Ferreira *et al.* (2019)).

Os resultados obtidos neste estudo para os testes antioxidantes corroboram com os de Rezende *et al.* (2022), que estudaram os efeitos bactericidas e antioxidantes dos óleos essenciais de *Satureja montana* L., *Myristica fragrans* H. e *Cymbopogon flexuosus* e viram um ótimo desempenho bactericida e antioxidante do óleo de *Satureja montana*.

4.4 Atividade antifúngica

Na Tabela 5 são apresentados valores de Concentração Mínima Inibitória (CMI) para os óleos essenciais em estudo.

Tabela 5: Concentração Mínima Inibitória dos óleos essenciais sobre o fungo *Penicillium expansum*.

Presença de halo de inibição				
Concentração (µL mL ⁻¹)				
Fungo	Segurelha	Folhas de pêssego	Fluodioxonil	DMSO
<i>P. expansum</i>	1,56	6,25	2	NI

Legenda: NI – não ocorreu inibição; DMSO – dimetilsulfóxido.

Fonte: Do autor (2024).

Os resultados obtidos revelam um ótimo desempenho dos óleos essenciais de segurelha e folhas de pêssego sobre o fungo *Penicillium expansum*; porém, o óleo de

segurelha tem maior potencial. Estudos sobre a atividade antifúngica de OEs descrevem a relação entre a estrutura química de diferentes componentes e a eficácia antifúngica. A ordem básica para essa eficácia antifúngica de diferentes grupos de componentes de OE é fenol > álcool > aldeído > cetona > éster > hidrocarboneto (Kalemba; Kunicha, 2003), dessa forma, destaca-se o maior desempenho da segurelha.

De acordo com estudos de Andrade *et al.* (2019), a alta eficácia antifúngica dos constituintes fenólicos se deve à desintegração da permeabilidade da membrana. Como a membrana dos fungos é composta por vários constituintes, incluindo o ergosterol (um composto esteroide que atua como modulador de fluidez da membrana fúngica), qualquer efeito sobre esse metabólito secundário causa um desequilíbrio nessa fluidez, promovendo alterações homeostáticas intracelulares. Assim, qualquer alteração nessa estrutura celular pode vir a tornar o ambiente fúngico intracelular incompatível com a sua sobrevivência, o que pode ter ocorrido para que os óleos fossem capazes de causar a inibição do fungo (SOUZA *et al.*, 2011).

4.5 Testes Antibacterianos

4.5.1 Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB)

A Tabela 6 e a Tabela 7 apresentam os resultados do teste de Concentração Mínima Inibitória e Concentração Mínima Bactericida (CMB) dos óleos essenciais sobre as bactérias *S. aureus* e *E. coli*.

Tabela 6 - Concentração Mínima Inibitória e Concentração Mínima Bactericida sobre a bactéria *S. aureus*.

Óleo Essencial	CMI ($\mu\text{L mL}^{-1}$)	CMB ($\mu\text{L mL}^{-1}$)
Folhas de pêssego	6,25	12,5
Segurelha	0,78	1,56

Fonte: Do autor (2024).

Tabela 7 - Concentração Mínima Inibitória e Concentração Mínima Bactericida sobre a bactéria *E. coli*.

Óleo Essencial	CMI ($\mu\text{L mL}^{-1}$)	CMB ($\mu\text{L mL}^{-1}$)
Folhas de pêssego	1,56	3,12
Segurelha	0,78	1,56

Fonte: Do autor (2024).

O óleo essencial de segurelha apresentou a mesma CMI e CMB para ambas as bactérias avaliadas, ao passo que os valores de CMI e CMB, para o óleo essencial de folhas de pêssego sobre cepas de *S. aureus* e *E. coli*, diferiram. Rezende *et al.* (2022) obtiveram CMI e CMB para *Satureja montana* de 6,25 e 50 $\mu\text{L mL}^{-1}$, respectivamente. O óleo essencial de folhas de pêssego foi mais eficaz na inibição do crescimento de *E. coli* do que para cepas de *S. aureus*.

O carvacrol e o sinergismo entre os constituintes presentes no óleo de segurelha podem explicar a maior atividade, quando comparados ao óleo essencial de folhas de pêssego uma vez que o óleo essencial de folhas de pêssego apresentou somente benzaldeído como constituinte. Maurya *et al.* (2021) apontam que a presença de conteúdo fenólico em OEs exibe mais propriedades para a inibição do crescimento microbiano com base em seu grupo hidroxila efetivo em estruturas químicas, que ajudam na ruptura da estrutura da membrana plasmática e, portanto, desorganizam a permeabilidade da membrana.

Hui *et al.* (2017) investigaram a relação estrutura-atividade (SAR) de compostos como timol, eugenol, carvacrol, cinamaldeído, nerol, citral, linalol, geraniol, α -terpineol e perilaldeído, para atividade antimicrobiana, ao direcionar a enzima 1-desoxi-D-xilulose 5-fosfato reductoisomerase (DXR) em *E. coli*. A capacidade de ligação dos compostos foi baseada em sua lipofilicidade, permitindo que eles causassem mais efeitos estruturais na membrana plasmática e nos componentes celulares. Além disso, os grupos hidroxila fenólicos e elétrons deslocalizados presentes em timol, carvacrol e eugenol mostraram o melhor efeito na ação antimicrobiana devido à forte ligação com a enzima DXR. Por outro lado, os aldeídos (perilaldeído, cinamaldeído), a cetona (citral) e o componente monoterpênico (α -terpineol) não apresentaram nenhuma ação inibitória detectável contra a proteína DXR.

4.5.2 Teste liberação de íons potássio

De acordo com Camargo *et al.* (2020), o efluxo de íons potássio e a liberação de materiais celulares absorventes a 260 nm para o exterior da célula são indícios do comprometimento da permeabilidade e integridade da membrana celular bacteriana. A membrana celular funciona como uma barreira entre o meio externo e interno da célula, permitindo a passagem de eletrólitos essenciais para as variadas funções celulares, como os íons K^+ . O vazamento desses íons indica um aumento da permeabilidade ou ruptura da membrana celular e esse aumento da permeabilidade afeta o metabolismo celular bacteriano e pode levar à lise celular.

Nas Tabelas 8 e 9, são apresentados os resultados do teste de Liberação de Íons K^+ das bactérias *S. aureus* e *E. coli*, pelos óleos essenciais em estudo.

Tabela 8 - Efeito dos óleos essenciais na liberação de íons potássio (em $mg L^{-1}$) para *S. aureus*.

Amostra	0 horas	2 horas	4 horas	6 horas	24 horas
<i>S. aureus</i>	400	700	700	700	700
Folhas de pêssego	400	400	400	400	400
Segurelha	400	400	400	400	400

Fonte: Do autor (2024)

Tabela 9 - Efeito dos Óleos Essenciais na Liberação de Íons Potássio (em $mg L^{-1}$) para *E. coli*

Amostra	0 horas	2 horas	4 horas	6 horas	24 horas
<i>E. coli</i>	400	700	1000	1000	1000
Folhas de pêssego	400	400	400	400	400
Segurelha	400	400	400	400	400

Fonte: Do autor (2024)

Pelos dados obtidos, foi observado que a liberação de íons potássio foi constante nos diferentes tempos e tratamentos, ou seja, nenhum óleo essencial foi capaz de promover a liberação de íons potássio. Os controles bacterianos sofreram aumento no extravasamento após um certo tempo de incubação, provavelmente por estar atribuído à morte natural do microrganismo. De acordo com Nogueira *et al.* (2021), o aumento na

perda de íons potássio observado nos controles bacterianos não foi registrado nas amostras tratadas, possivelmente porque elas impediram a multiplicação bacteriana de forma eficaz, evitando, assim, a proliferação excessiva dos microrganismos, como ocorreu nos controles.

4.5.3 Teste de liberação de constituintes celulares absorventes em 260 nm

Nas Tabelas 10 e 11, são apresentados os dados obtidos para absorbância do teste de liberação de constituintes celulares na faixa de 260 nm, para as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Tabela 10 - Liberação de constituintes celulares de *E. coli* induzida pelos óleos essenciais.

Amostra	Tempo 0	Tempo 1	Tempo 2	Tempo 3	Tempo 4	Tempo 5
<i>E. coli</i>	0,6717 ^{aA}	0,7171 ^{aA}	0,7178 ^{aA}	0,7163 ^{aA}	0,7778 ^{aA}	0,7738 ^{aA}
Segurelha	0,6740 ^{aA}	0,7181 ^{aA}	0,7354 ^{aA}	0,7042 ^{aA}	0,6870 ^{aA}	0,6956 ^{aA}
Folhas de pêssego	3,0320 ^{bA}	3,0130 ^{bA}	3,0053 ^{bA}	3,3451 ^{bA}	3,5580 ^{bA}	3,3974 ^{bA}

As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade. As médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2024)

Tabela 11 - Liberação de constituintes celulares de *S. aureus* induzida pelos óleos essenciais.

Amostra	Tempo 0	Tempo 1	Tempo 2	Tempo 3	Tempo 4	Tempo 5
<i>S. aureus</i>	0,6763 ^{aA}	0,6659 ^{aA}	0,7015 ^{aA}	0,7012 ^{aA}	0,7061 ^{aA}	0,7155 ^{aA}
Segurelha	0,7575 ^{aA}	0,7109 ^{aA}	2,2246 ^{bB}	0,9454 ^{aA}	0,9061 ^{aA}	0,9584 ^{aA}
Folhas de pêssego	3,2149 ^{bA}	3,8208 ^{bB}	3,6015 ^{cB}	3,0001 ^{bA}	3,8271 ^{bB}	2,7201 ^{bA}

As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade. As médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2024)

De acordo com os dados descritos nas tabelas, é possível observar que os valores obtidos no tratamento com segurelha e o controle bacteriano nos testes para *E. coli* não apresentaram variação significativa; porém, quando comparado com o tratamento de

folhas de pêssego, ocorreu uma variação, isso pode ser um indicativo de que o óleo promoveu liberação de constituintes celulares. Já para os tratamentos com *S. aureus*, foi possível observar uma variação significativa no tempo 2 para o tratamento com segurelha, ou seja, indicativo de que o óleo foi capaz de liberar constituintes celulares; porém, logo ocorreu uma diminuição da absorbância. O ocorrido pode ser justificado pelo fato de que as moléculas liberadas (peptídeos, proteínas, enzimas, entre outras), após a ruptura celular, podem ter sido incorporadas pelos microrganismos sobreviventes para seu próprio metabolismo (Nogueira *et al.*, 2021).

Nazzaro *et al.* (2013) mencionam que os óleos essenciais e alguns de seus constituintes químicos, por apresentarem características lipofílicas, podem interagir com lipídios da membrana para alterar a permeabilidade, integridade, capacidade osmorregulatória ou funções estruturais e causar o vazamento de íons ou conteúdo celular, lise e morte celular, resultados que corroboram com os encontrados neste trabalho.

4.5.4 Teste da permeabilidade da membrana

As Tabelas 12 e 13 apresentam os resultados do teste de permeabilidade da membrana das bactérias *S. aureus* e *E. coli*.

Tabela 12 - Efeito dos Óleos Essenciais na permeabilidade da membrana da bactéria *E. coli*.

Amostra	Cristal Violeta	
	% Livre	% Absorvida
Controle (cristal violeta)	98,62 ± 0,12 ^b	1,38 ± 0,007 ^a
Segurelha	96,58 ± 0,01 ^b	3,42 ± 0,11 ^b
Controle (cristal violeta)	88,9 ± 0,18 ^a	11,1 ± 0,23 ^d
Folhas de Pêssego	80,08 ± 0,12 ^a	19,92 ± 0,18 ^c

As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste Scott-knott, ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2024).

Tabela 13 - Efeito dos Óleos Essenciais na permeabilidade da membrana da bactéria *S. aureus*.

Cristal Violeta		
Amostra	% Livre	% Absorvida
Controle (cristal violeta)	96,27 ± 0,16 ^c	3,73 ± 0,12 ^a
Segurelha	93,51 ± 0,09 ^c	6,29 ± 1,03 ^b
Controle (cristal violeta)	88,46 ± 0,13 ^b	11,54 ± 0,04 ^c
Folhas de Pêssego	83,22 ± 0,15 ^a	16,78 ± 0,07 ^d

As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2024).

A quantidade de cristal violeta absorvido pode ser um indicativo da integridade da membrana estrutural da parede celular. Dessa forma, com os ensaios, pode-se estimar os danos causados à permeabilidade da membrana, correlacionando-se as diferenças percentuais de cristal violeta livre ou absorvidos ocasionados pelos tratamentos com óleos essenciais. Desse modo, pode-se perceber que o óleo essencial de folhas de pêssego causou maior impacto na permeabilidade da membrana do que o óleo essencial de segurelha.

Talvez a interação dos vários constituintes presentes no óleo essencial de segurelha tenham influenciado no teste de permeabilidade da membrana, uma vez que Nogueira *et al.* (2021) obtiveram maiores valores absorvidos de cristal violeta por compostos fenólicos, como eugenol e carvacrol, do que para compostos que apresentavam a função aldeídos em sua estrutura.

4.5.5 Teste de tolerância ao sal

Na Tabela 14, estão representados os resultados do teste de capacidade de tolerância a sal pelas bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, respectivamente.

Tabela 14 - Efeito dos Óleos Essenciais na capacidade de tolerância a sal.

Amostra	0 % NaCl	2,5 % NaCl	5% NaCl
<i>E. coli</i>	Incontável	1,97	1,6
Segurelha	NC	NC	NC
Folhas de Pêssego	2,34	2,06	0,8

Amostra	0 % NaCl	2,5 % NaCl	5% NaCl
<i>S. aureus</i>	Incontável	Incontável	2,13
Segurelha	NC	NC	NC
Folhas de Pêssego	2,64	2,46	2,55

Legenda: NC – não houve crescimento de colônias bacterianas.

Fonte: Do autor (2024)

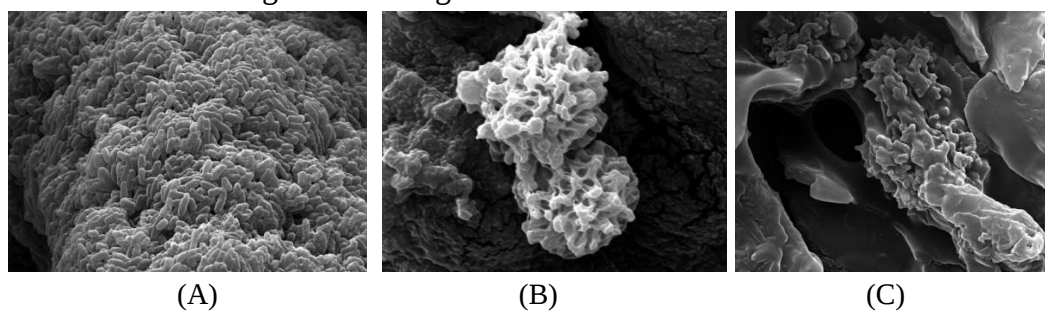
De acordo com Camargo *et al.* (2020), danos à membrana celular bacteriana também podem ser medidos indiretamente pela perda de tolerância ao sal ou pela capacidade de reduzir a formação de colônias em meio de cultura sólido suplementado com NaCl. Portanto, o teste de tolerância ao sal é indicativo de danos à membrana celular, resultando em alterações na permeabilidade da célula bacteriana. Isso é evidenciado por mudanças na capacidade osmorregulatória da membrana celular, ou seja, na capacidade de controlar as concentrações salinas dentro da célula, essenciais para sua atividade metabólica.

Por meio dos dados apresentados na Tabela 14, o óleo de segurelha foi capaz de reduzir totalmente a formação de colônias tanto para *Escherichia coli* quanto para *Staphylococcus aureus*. Isso pode ser um indicio que OE age direta ou indiretamente no equilíbrio osmótico ou na membrana plasmática, já o óleo essencial de folhas de pêssego não provocou essa redução, podendo assim inferir que ele não causa alterações na estrutura da membrana plasmática, sugerindo que o seu alvo seja intracelular, no citoplasma ou em enzimas citoplasmáticas (Nogueira *et al.*, 2021).

4.5.6 Avaliação da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Nas Figuras 14 e 15, estão apresentadas as imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura.

Figura 14 - Imagens bactéria *Escherichia coli*.

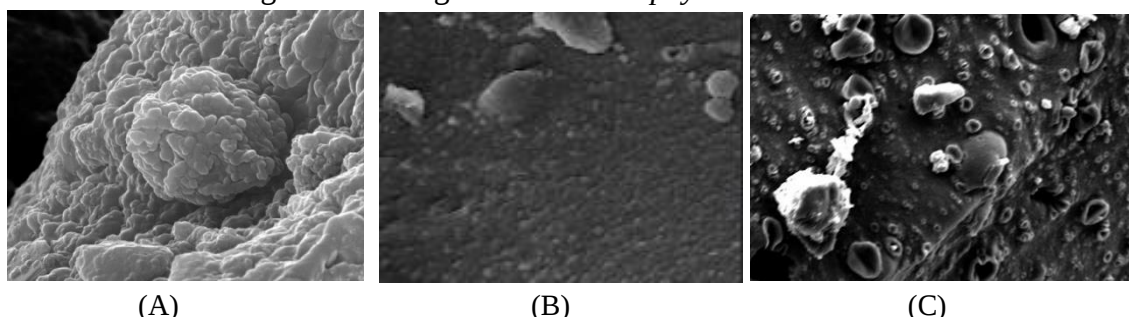


Legenda: (A) Controle bacteriano; (B) Tratamento com óleo essencial de segurelha; (C) Tratamento com óleo essencial de folhas de pêssego.

Fonte: Do autor (2024).

Por meio das imagens, foi possível perceber um decréscimo significativo na quantidade de células da colônia, sendo ainda possível constatar que houve deformação na estrutura da célula, quando se comparam os tratamentos (B e C) com o controle bacteriano (A), pois *E. coli* é uma bactéria Gram-negativa que se assemelha a um bacilo.

Figura 15 - Imagens bactéria *Staphylococcus aureus*.



Legenda: (A) Controle bacteriano; (B) Tratamento com óleo essencial de segurelha; (C) Tratamento com óleo essencial de folhas de pêssego.

Fonte: Do autor (2024).

As imagens permitem visualizar que, no caso da *S. aureus* também, ocorreu um decréscimo significativo na quantidade de células bacterianas.

Os dados obtidos para ambas as bactérias corroboram com os de Rezende *et al.*, (2022), visto que os óleos estudados por eles também reduziram a quantidade de bactérias. De acordo com estudos de García-Salinas *et al.* (2018), a presença de grupos hidroxila altera e compromete o metabolismo energético, o que acaba influenciando a expressão gênica, e pode ter ocorrido para o óleo essencial de segurelha. Rezende *et al.* (2022) destacam que grupos hidroxila alcoólicos também contribuem para os resultados morfológicos obtidos, pois ocorreu uma diminuição significativa do crescimento das bactérias.

Nogueira *et al.* (2021), ao estudarem padrões sobre as bactérias, dentre eles um aldeído (*trans*-cinamaldeído), verificaram que eles são capazes de causar extravasamento de materiais e íons intracelulares, o que pode ter ocorrido com o óleo de folhas de pêssogo, que apresentou benzaldeído como constituinte.

5 CONCLUSÕES

O óleo essencial de segurelha apresentou como constituintes majoritários carvacrol, *p*-cimeno e hexadecanol; e o óleo de folhas de pêssego, o benzaldeído.

O óleo essencial de segurelha apresentou IC₅₀ de 42.24 e 62.54 pelos métodos DPPH e Branqueamento do β -caroteno, respectivamente. Ao passo que o óleo essencial de folhas de pêssego não apresentou atividade pelo método DPPH, e IC₅₀ maior que 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ pelo método Branqueamento do β -caroteno. Pelo método do poder redutor, o OE de segurelha se sobressaiu, quando comparado com o OE de folhas de pêssego, observado pela inclinação da reta, que apresentou valores de $(5,1902 \times 10^{-4})$ e $(7,9641 \times 10^{-5})$, respectivamente.

O mecanismo de ação foi comprovado para o óleo essencial de segurelha, provocando danos à membrana bacteriana, provavelmente por alterar sua permeabilidade, observada pelos testes de tolerância a sal e liberação de constituintes celulares, enquanto o óleo de folhas de pêssego causou um dano menor a membrana plasmática.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oils componentes by gas chromatography/mass spectroscopy**. 4.1 ed. Carol Stream: Allured, p.804. 2017
- ANDRADE, J. C *et al.* Control of bacterial and fungal biofilms by natural products of *Ziziphus joazeiro* Mart. (Rhamnaceae). **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 65, p. 226-233, 2019.
- ANDRADE, M. A *et al.* Biological activity of the essential oils from *Cinnamodendron dinisii* and *Siparuna guianensis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 189-194, 2015.
- ANDRADE, M. A. *et al.* Óleos Essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* *Zingiber officinale*: Composição, Atividades Antioxidante e Antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 2, p. 399-408, abr-jun, 2012.
- BAKKALI, F. *et al.* **Biological effects of essential oils. Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, Feb, 2008.
- BATISTA, L. R. **Toxinfecções alimentares**. Lavras: Editora UFLA, 2014.
- BINTSIS, T. Foodborne pathogens. **AIMS microbiology**, v. 3, n. 3, p. 529, 2017.
- BRANDÃO, R. M. *et al.* In vitro and in vivo efficacy of poly (lactic acid) nanofiber packaging containing essential oils from *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum gratissimum* L. against *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus niger* in table grapes. **Food Chemistry**, v. 400, p. 134087, 2022.
- BRANDÃO, R. M. *et al.* In vitro and in vivo efficacy of poly (lactic acid) nanofiber packaging containing essential oils from *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum gratissimum* L. against *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus niger* in table grapes. **Food Chemistry**, v. 400, p. 134087, 2023.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Farmacopeia Brasileira**, Brasília, 5th ed.; n. 1, p. 198-199, 2010.
- CAMARGO, K. C *et al.* Antibacterial action of the essential oil from *Cantinoa carpinifolia benth* against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* strains. **Flavour and fragrance journal**, v. 35, n. 1, p. 99-106, 2020.
- CLÉBIS, V. H *et al.* Antibacterial effect and clinical potential of honey collected from *Scaptotrigona bipunctata* *Lepeletier* (1836) and Africanized bees *Apis mellifera* *Latreille* and their mixture. **Journal of Apicultural Research**, v. 60, n. 2, p. 308-318, 2021.
- DE OLIVEIRA, M. M. M *et al.* Morphological alterations in sessile cells of *Listeria monocytogenes* after treatment with *Cymbopogon* sp. essential oils. **Magistra**, v. 26, n. 3, p. 385-392, 2017.

- DE OLIVEIRA, T. L. C *et al.* Antimicrobial activity of *Satureja montana* L. essential oil against *Clostridium perfringens* type A inoculated in mortadella-type sausages formulated with different levels of sodium nitrite. **International journal of food microbiology**, v. 144, n. 3, p. 546-555, 2011.
- DE OLIVEIRA, T. L. C *et al.* Antioxidant effects of *Satureja montana* L. essential oil on TBARS and color of mortadella-type sausages formulated with different levels of sodium nitrite. **LWT-Food Science and Technology**, v. 45, n. 2, p. 204-212, 2012.
- DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3. Ed. Ottana: J. Wiley, p. 539, 2008.
- DIAO, W. R *et al.* Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). **Food control**, v. 35, n. 1, p. 109-116, 2014.
- DUARTE-ALMEIDA, J. M *et al.* Avaliação da atividade antioxidante utilizando o sistema β -caroteno/ácido linoléico e métodos de sequestro de radicais DPPH. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 446-452, abr/jun. 2006.
- EL ASBAHANI, A. *et al.* Essential oils: from extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 483, n. 1, p. 220-243, 2015.
- ERRAMPALLI, D. *Penicillium expansum* (blue mold). In: **Postharvest decay**. Academic Press, 2014. p. 189-231.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistic al analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p.1039-1042, 2011.
- FERREIRA, V. R. F *et al.* Colorimetric, electroanalytical and theoretical evaluation of the antioxidant activity of *Syzygium aromaticum* L., *Origanum vulgare* L., *Mentha spicata* L. and *Eremanthus erythropappus* M. essential oils, and their major constituents. **New Journal of Chemistry**, v. 43, n. 20, p. 7653-7662, 2019.
- FUNG, F; WANG, H; MENON, S. Food safety in the 21st century. **Biomedical journal**, v. 41, n. 2, p. 88-95, 2018.
- GARCÍA-SALINAS, S *et al.* Evaluation of the antimicrobial activity and cytotoxicity of different components of natural origin present in essential oils. **Molecules**, v. 23, n. 6, p. 1399, 2018.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.
- GOMES, M. S *et al.* Effect of edible coatings with essential oils on the quality of red raspberries over shelf-life. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 3, p. 929-938, 2017.
- HAN, Y; SUN, Z; CHEN, W. Antimicrobial susceptibility and antibacterial mechanism of limonene against *Listeria monocytogenes*. **Molecules**, v. 25, n. 1, p. 33, 2019.

HUI, X *et al.* Antimicrobial mechanism of the major active essential oil compounds and their structure–activity relationship. **Medicinal Chemistry Research**, v. 26, p. 442-449, 2017.

ISO 9235:2021. *Aromatic natural raw materials* - Vocabulary. **International Organization for Standardization**: Genebra, 2021.

JMAN REDZIC, S. Wild edible plants and their traditional use in the human nutrition in Bosnia-Herzegovina. **Ecology of Food and Nutrition**, v. 45, n. 3, p. 189-232, 2006.

KALEMBA, D. A. A. K.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current medicinal chemistry**, v. 10, n. 10, p. 813-829, 2003.

KOWALCHIK, C e HYLTON, W. H. **Sabor de fazenda**. <https://sabordefazenda.com.br/ervas-do-mediterraneo/3068-2/>. Acesso em: 11 mar. 2024

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

KUMAR, V *et al.* Antioxidant potential of essential oils from some *Himalayan Asteraceae* and *Lamiaceae* species. **Medicine in Drug Discovery**, v. 1, p. 100004, 2019.

LORENZO, J. M. *et al.* Main groups of microorganisms of relevance for food safety and stability: General aspects and overall description. In: **Innovative technologies for food preservation**. Academic Press, 2018. p. 53-107.

MA. J. **Plantafor**. Disponível em: <https://m.planfor.pt/comprar,pessegueiro-de-vinha-com-carne-branca,0134,PO>. Acesso em: 10 jul. 2023

MAURYA, A *et al.* Essential oils and their application in food safety. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 5, p. 653420, 2021.

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

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

NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard-Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003a.

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**). 6th edn. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA, 2003b.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). **Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline.** NCCLS document M26-A. 1st edn. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 1999.

National Geographic Society. ***Escherichia coli (E.coli)***. Disponível em: <https://education.nationalgeographic.org/resource/escherichia-coli-e-coli/>. Acesso em: 25 mai. 2024

NAZZARO, F *et al.* Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 12, p. 1451-1474, 2013.

NEMATİ, Z. *et al.* Chemical composition and antioxidant activity of Iranian *Satureja montana*. **Sci. Int**, v. 6, p. 39-43, 2018.

NOGUEIRA, J. O *et al.* Mechanism of action of various terpenes and phenylpropanoids against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 368, n. 9, p. fnab052, 2021.

NOVAES, N. S; YAMAMOTO, R. R; MARQUES, R. N. Entomofauna capturada em pomar recém-implantado de pessegueiro e ameixeira no município de Buri, São Paulo, Brasil. **Entomology Beginners**, v. 2, p. e021-e021, 2021.

OLIVEIRA, C. M. **Caracterização química, atividade antibacteriana, antitumoral e ensaios antioxidantes do óleo essencial das folhas e flores de *Callistemon viminialis***. 2015. 111 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.

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

PALMIERI, D *et al.* Modulation of extracellular *Penicillium expansum*-driven acidification by *Papiliotrema terrestris* affects biosynthesis of patulin and has a possible role in biocontrol activity. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 973670, 2022.

PAYAL, A *et al.* A review on recent developments and applications of nanozymes in food safety and quality analysis. **Food Analytical Methods**, v. 14, p. 1537-1558, 2021.

PIMENTEL, F.A. *et al.* A convenient method for the determination of moisture in aromatic plants. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 373-375, jan. 2006.

PRAKASH, B *et al.* Nanoencapsulation: An efficient technology to boost the antimicrobial potential of plant essential oils in food system. **Food control**, v. 89, p. 1-11, 2018.

PREVEDELLO, M. T; COMACHIO, G. Antioxidantes e sua relação com os radicais livres, e Doenças Crônicas Não Transmissíveis: uma revisão de literatura. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 6, p. 55244-55285, 2021.

- PRIETO, P., PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, p. 337-341, 1999
- REZENDE, D. A. d. C. S *et al.* Bactericidal and antioxidant effects of essential oils from *Satureja montana* L., *Myristica fragrans* H. and *Cymbopogon flexuosus*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 74, n. 5, p. 741-751, 2022.
- SIMÕES, C. M. O *et al.* **Farmacognosia**. Porto Alegre: Artmed, 2017. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788582713655/> . Acesso em: 29 jun. 2023.
- SOKOLIK, C. G. *et al.* Proteinaceous microspheres as a delivery system for carvacrol and thymol in antibacterial applications. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 41, p. 288-296, 2018.
- SOUZA, A. B. *et al.* Antimicrobial activity of terpenoids from *Copaifera longsdorffii* Desf. Against cariogenic bacteria. **Phytotherapy research**, London, v. 25, n.2, p. 215-220, 2011.
- SPECIAN, V. *et al.* Metabólitos secundários de interesse farmacêutico produzidos por fungos endofíticos. Unopar Científica – **Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 16, n. 4, p. 345-351, 2014.
- TAVARES, J. C. **Microbiologia e Farmacologia Simplificada**. Rio de Janeiro: Thieme Brazil, 2018. *E-book*. ISBN 9788554650674. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788554650674/> . Acesso em: 25 mai. 2024.
- TEIXEIRA, M. L. *et al.* Essential Oils from *Lippia origanoides* Kunth. and *Mentha spicata* L.: Chemical Composition, Insecticidal and Antioxidant Activities. **American Journal of Plant Sciences**. v. 5, n. 9, p. 1181, Apr., 2014.
- TEIXEIRA, M. L. **Óleos Essenciais de Lippia origanoide Kunth. E Mentha spicata L.: Composição Química, Potencialidades Biológicas e Caracterização das estruturas secretoras**. 2013. 126 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.
- VERMA, R. S. *et al.* Natural benzaldehyde from *Prunus persica* (L.) Batsch. **International Journal of Food Properties**, v. 20, n. sup2, p. 1259-1263, 2017.
- VITANZA, L *et al.* *Satureja montana* L. essential oil and its antimicrobial activity alone or in combination with gentamicin. **Microbial Pathogenesis**, v. 126, p. 323-331, 2019.
- WU, H *et al.* Essential oil extracted from peach (*Prunus persica*) kernel and its physicochemical and antioxidant properties. **LWT-Food Science and Technology**, v. 44, n. 10, p. 2032-2039, 2011.

YANG, X. N; 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**, v. 8, n. 9, p. 694-700, 2015.

ZHANG, W *et al.* Effective strategies of sustained release and retention enhancement of essential oils in active food packaging films/coatings. **Food Chemistry**, v. 367, p. 130671, 2022.

ZHANG, Y *et al.* Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Food control**, v. 59, p. 282-289, 2016.