



DANÚBIA APARECIDA DE CARVALHO SELVATI REZENDE

**ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Satureja montana* L., *Myristica fragrans* H. E *Cymbopogon flexuosus*: EXTRAÇÃO,
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS
ATIVIDADES BIOLÓGICAS**

**LAVRAS-MG
2020**

DANUBIA APARECIDA DE CARVALHO SELVATI REZENDE

ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Satureja montana* L., *Myristica fragrans* H. E *Cymbopogon flexuosus*: EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

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

Orientadora

Dra. Maria das Graças Cardoso

Coorientador

Dr. Rafael Neodini Remedio

**LAVRAS – MG
2020**

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

Rezende, Danubia Aparecida de Carvalho Selvati.

Óleos essenciais de *Satureja montana* L., *Myristica fragrans* H.
e *Cymbopogon flexuosus*: extração, caracterização química e
avaliação das atividades biológicas / Danubia Aparecida de
Carvalho Selvati Rezende. - 2020.

125 p. : il.

Orientador(a): Maria das Graças Cardoso.

Coorientador(a): Rafael Neodini Remedio.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Produtos naturais. 2. Ectoparasitos; acetilcolinesterase. 3.
Estresse oxidativo; toxinas. I. Cardoso, Maria das Graças. II.
Remedio, Rafael Neodini. III. Título.

DANÚBIA APARECIDA DE CARVALHO SELVATI REZENDE

ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Satureja montana* L., *Myristica fragrans* H. E *Cymbopogon flexuosus*: EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

ESSENTIAL OILS FROM *Satureja montana* L., *Myristica fragrans* H. AND *Cymbopogon flexuosus*: EXTRACTION, CHEMICAL CHARACTERIZATION AND EVALUATION OF BIOLOGICAL ACTIVITIES

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

APROVADA em 20 de fevereiro de 2020.

Dr. Luís Roberto Batista	UFLA
Dr. Eduardo Alves	UFLA
Dr. Luiz Gustavo de Lima Guimarães	UFSJ

Dra. Maria das Graças Cardoso
Orientadora

Dr. Rafael Neodini Remedio
Coorientador

LAVRAS – MG

2020

A Deus e a Nossa Senhora Aparecida, por me sustentarem em todos os momentos do doutorado, erguendo-me cada vez que eu pensava em desistir.

Aos meus pilares, Denize e Valdoil, por caminharem junto comigo nessa estrada nebulosa... não foi fácil!

Ao meu irmão, Delúbio, e à minha cunhada, Giselle, pelo carinho nos momentos que eu me sentia sozinha!

Ao meu anjo da guarda, Alice, por me ensinar o que é amar alguém além de nós mesmos!

Ao meu amigo, companheiro, marido, Anderson, pela presença constante, cuidado, carinho e paciência.

Aos meus amigos Vanuzia, Rafaela, Allan, Alex e Isaac, por me mostrarem um caminho quando eu não mais o avistava!

À professora Graça, pela confiança, amizade e conselhos.

Dedico

Agradecimentos

A Deus e a Nossa Senhora Aparecida, por caminharem comigo, sempre mostrando que, apesar de tudo, eu posso permanecer de pé.

À Universidade Federal de Lavras e aos Departamentos de Química, Ciência dos Alimentos, Medicina Veterinária e Fitopatologia, por permitirem a realização deste trabalho. Também agradeço aos funcionários do Departamento de Química, por toda a atenção e auxílio prestados.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), pelo suporte financeiro.

À professora Dra. Maria das Graças Cardoso, pelos conselhos, ensinamentos, preocupação, amizade, pelas oportunidades e principalmente pela confiança e fidelidade. Você é uma pessoa extraordinária, uma orientadora inigualável. A você, meus sinceros agradecimentos!

À minha mãe, Denize, e meu pai, Valdoil, por serem meus pais. Quantas vezes tirei o sono de vocês... Quantas vezes preocupei vocês... Mas sempre senti o quanto vocês me amam... O que tenho a dizer senão... Muito obrigada!

À minha filha, Alice. Saiba que você é minha melhor metade, meu melhor sorriso, a esperança de toda manhã e o sonho de toda noite. Sou capaz de tudo pela sua felicidade! Como eu amo você...

Ao meu marido, Anderson, pela paciência, companheirismo e carinho. Por caminhar sempre ao meu lado, mesmo quando eu não queria companhia!

Ao meu irmão, Delúbio; pois, o sangue que temos em comum não é a única coisa que nos une. Somos verdadeiros amigos, crescemos e vivemos momentos inesquecíveis juntos!

À minha sogra, Elaine, e meu sogro, Carlos, pela preocupação, pelo carinho e pelos cuidados dedicados à Alice.

À minha cunhada, Giselle, pela amizade, pelo carinho, pelos cuidados e pelas doces palavras.

Ao Prof. Rafael Neodini Remedio, pela rica coorientação, pela prestabilidade, paciência, dedicação e disponibilidade em contribuir com este trabalho.

Ao Prof. Luis Roberto Batista, pela disponibilidade, paciência, pelos ensinamentos e principalmente por me acolher e me ensinar que um sorriso pode mudar tudo.

Ao Prof. Eduardo Alves, pela disponibilidade, por ter aberto as portas do seu laboratório para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. David Lee Nelson (UFVJM-MG), pela disponibilidade e sempre contribuir com nossos trabalhos.

Aos amigos do laboratório de Química Orgânica - Óleos Essenciais e de Análise de Qualidade de Aguardente, Vanuzia, Rafaela, Alex, Allan, Marcos, Gislaine, Richard, Gabriela Campolina, Gabriela, Renan, Cleusa e Maria Luisa pelo companheirismo, auxílio na condução do experimento e pelo prazer da convivência diária.

E aqueles que, atualmente, não estão no laboratório, mas deixaram muitas histórias e muito aprendizado, Karen, Luana, Jéssica, Rafaela Vieira e Stéfano.

Em especial, agradeço pela amizade, pelo companheirismo, ajuda, atenção, pela enorme paciência e compreensão dos meus anjos da guarda Vanuzia, Rafaela, Allan, Alex, Richard, Nathasha, Isaac e Raquel. “É a amizade que nos dá força para continuar sorrindo quando o resto do mundo tenta nos esmagar.”

Às meninas do Laboratório de Micotoxinas e Micologia de Alimentos do DCA, Nathasha, Fabi e Suzana.

À Profa. Dra. Josefina Aparecida de Sousa, pelo exemplo profissional, amizade, apoio e convivência.

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

RESUMO

Atualmente a utilização de óleos essenciais com potencial biológico vem ganhando espaço, sendo cada vez mais utilizados nas indústrias de cosméticos, farmacêuticas, alimentícias e agrícolas. Neste estudo objetivou-se extrair e caracterizar quimicamente os óleos essenciais de três espécies de plantas, *Satureja montana* L., *Myristica fragrans* H. e *Cymbopogon flexuosus*, bem como avaliar as atividades antioxidantes, fungicida, bactericida e repelente, efeito inibitório sobre acetilcolinesterase e avaliar o efeito dos óleos essenciais na morfologia de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* e de fungos do gênero *Aspergillus* por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Os óleos essenciais foram extraídos por hidrodestilação, caracterizados e quantificados quimicamente por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/MS) e Cromatografia Gasosa acoplada ao Detector de Ionização de Chamas (CG/FID). O efeito dos óleos essenciais em inibir a enzima AChE foi avaliado por meio da taxa de formação do composto 5-tio-2-nitrobenzoato, produzido a partir da reação do Reagente de Ellman com a tiocolina. O efeito repelente foi realizado ao abrigo da luz, em ambiente com temperatura e umidade relativa controladas: um filtro de papel circular foi cortado ao meio; em uma metade, empregou-se DMSO 3% e, em outra, o óleo essencial diluído em DMSO 3% em concentrações variadas; em seguida, seis carrapatos adultos em jejum da espécie *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato foram adicionados ao centro da placa e suas posições foram avaliadas após cinco minutos. O potencial antibacteriano contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* foi avaliado por ensaios do teste de sensibilidade celular e por análises de MEV. A avaliação da atividade antioxidante foi baseada nos ensaios de estabilização dos radicais DPPH, branqueamento de β -caroteno e poder redutor. A avaliação do efeito inibitório dos óleos essenciais, a interferência dos óleos no crescimento micelial e na inibição da síntese de ergosterol foram testadas sobre as espécies *A. flavus* (CCDCA 10508) e *A. ochraceus* (CCDCA 10506). A atividade antiaflatoxigênica dos óleos essenciais foi avaliada por meio da inibição da biossíntese de AFB₁ e AFB₂ de *A. flavus* em meio de cultura contendo diferentes concentrações de cada óleo essencial. A atividade antiocratoxigênica dos óleos essenciais foi avaliada por meio da inibição da biossíntese de OTA pelo fungo *Aspergillus ochraceus*. Os componentes majoritários encontrados no óleo essencial de *S. montana* foram borneol, γ -terpineol, carvacrol e p-cimeno, a espécie *M. fragrans* apresentou sabineno, α -pineno e β -pineno e, na composição do óleo essencial de *C. flexuosus*, foram encontrados geranial e neral. No efeito inibitório da acetilcolinesterase, os óleos essenciais que apresentaram maior potencial foram *S. montana* e *M. fragrans*, com valores de IC₅₀ próximos, 0,024 e 0,023 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. As porcentagens de repelência com concentrações variáveis foi maior para o óleo essencial de *S. montana*, atingindo 60% de repelência na menor concentração. Porém, no ensaio com concentração constante e tempo variável, o óleo essencial de *S. montana* e *C. flexuosus* mostraram-se eficazes até 60 minutos depois da aplicação. No efeito inibitório e bactericida, o óleo essencial de *S. montana* apresentou a mesma concentração mínima e bactericida, 6,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$, sobre *E. coli*, e frente a *S. aureus*, o óleo essencial de *C. flexuosus* foi mais eficaz, apresentando uma CMI de 6,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$ e uma CMB de 12,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$. As análises realizadas no MEV mostraram que os óleos essenciais causaram danos à membrana e parede celular das bactérias utilizadas. Nenhum óleo essencial apresentou potencial sequestrador de radicais DPPH•; no entanto, os óleos de *S. montana* e *M. fragrans* apresentaram um baixo potencial no método do branqueamento do β -caroteno com IC₅₀ de 45,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 177,63 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Na redução do ferro, o óleo essencial de *S. montana* apresentou uma inclinação de $2,9 \times 10^{-4}$, mostrando um potencial para reduzir íons ferro em solução, ao passo que os óleos essenciais de *M. fragrans* e *C. flexuosus* não apresentaram tal potencial, pois apresentaram menores inclinações. A atividade antifúngica dos óleos essenciais foi observada

para todos os fungos testados. Os óleos essenciais em estudo apresentaram nas concentrações testadas bons resultados, inibindo o crescimento micelial, a produção de ocratoxina A e aflatoxinas B₁ e B₂ e a síntese de ergosterol. Foi observada uma redução no crescimento micelial e no teor de ergosterol; portanto, sugere-se a ação dos óleos essenciais sobre a membrana plasmática do fungo.

Palavras-chave: Produtos naturais, enzima, ectoparasitos, estresse oxidativo e toxinas.

ABSTRACT

Currently, the use of essential oils with biological potential is gaining ground, being increasingly used in the cosmetics, pharmaceutical, food and agricultural industries. This study aimed to extract and chemically characterize the essential oils of three plant species, *Satureja montana* L., *Myristica fragrans* H. and *Cymbopogon flexuosus*, as well as to evaluate the antioxidant, fungicidal, bactericidal and repellent activities, inhibitory effect on acetylcholinesterase and to evaluate the effect of essential oils on the morphology of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* and fungi of the *Aspergillus* genus by means of Scanning Electron Microscopy (MEV). The essential oils were extracted by hydrodistillation, characterized and chemically quantified by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (CG / MS) and Gas Chromatography coupled to the Flame Ionization Detector (CG / FID). The effect of essential oils in inhibiting the AChE enzyme was evaluated by the rate of formation of the compound 5-thio-2-nitrobenzoate, produced from the reaction of Ellman's Reagent with thiocoline. The repellent effect was carried out protected from light, in an environment with controlled temperature and relative humidity: a circular paper filter was cut in half; in one half, 3% DMSO was used and, in another, the essential oil diluted in 3% DMSO in varying concentrations; then, six fasting adult ticks of the species *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato were added to the center of the plate and their positions were evaluated after five minutes. The antibacterial potential against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* was assessed by tests of the cellular sensitivity test and by MEV analyzes. The evaluation of antioxidant activity was based on the DPPH radical stabilization tests, β -carotene bleaching and reducing power. The evaluation of the inhibitory effect of essential oils, the interference of the oils in the mycelial growth and in the inhibition of the ergosterol synthesis were tested on the species *A. flavus* (CCDCA 10508) and *A. ochraceus* (CCDCA 10506). The antiaflatoxic activity of essential oils was evaluated by inhibiting the biosynthesis of AFB1 and AFB2 of *A. flavus* in culture medium containing different concentrations of each essential oil. The anti-craotoxic activity of essential oils was evaluated by inhibiting OTA biosynthesis by the fungus *Aspergillus ochraceus*. The major components found in the essential oil of *S. montana* were borneol, γ -terpineol, carvacrol and p-cymene, the species *M. fragrans* presented sabinene, α -pinene and β -pinene and, in the composition of the essential oil of *C. flexuosus*, geranial and neral were found. In the inhibitory effect of acetylcholinesterase, the essential oils that showed the greatest potential were *S. montana* and *M. fragrans*, with IC_{50} values close to 0.024 and 0.023 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. The percentage of repellency with variable concentrations was higher for the essential oil of *S. montana*, reaching 60% repellency at the lowest concentration. However, in the test with constant concentration and variable time, the essential oil of *S. montana* and *C. flexuosus* proved to be effective up to 60 minutes after application. In the inhibitory and bactericidal effect, the essential oil of *S. montana* showed the same minimum and bactericidal concentration, 6.25 $\mu\text{L mL}^{-1}$, on *E. coli*, and compared to *S. aureus*, the essential oil of *C. flexuosus* was more effective, presenting a CMI of 6.25 $\mu\text{L mL}^{-1}$ and a CMB of 12.5 $\mu\text{L mL}^{-1}$. The analyzes carried out in the MEV showed that the essential oils caused damage to the membrane and cell wall of the bacteria used. No essential oil showed a potential scavenger of DPPH• radicals; however, oils from *S. montana* and *M. fragrans* showed low potential in the β -carotene bleaching method with an IC_{50} of 45.50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 177.63 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. In the reduction of iron, the essential oil of *S. montana* presented an inclination of 2.9×10^{-4} , showing a potential to reduce iron ions in solution, whereas the essential oils of *M. fragrans* and *C. flexuosus* did not present such potential, as they presented less inclinations. The antifungal activity of essential oils was observed for all tested fungi. The essential oils under study showed good results in the tested concentrations, inhibiting mycelial growth, the

production of ochratoxin A and aflatoxins B1 and B2 and the synthesis of ergosterol. A reduction in mycelial growth and ergosterol content was observed; therefore, the action of essential oils on the fungal plasma membrane is suggested.

Keywords: Natural products, enzyme, ectoparasites, oxidative stress and toxins.

Sumário

PRIMEIRA PARTE	2
1. INTRODUÇÃO GERAL	3
2. REFERENCIAL TEÓRICO	5
2.1 Metabólitos secundários das plantas.....	5
2.2 Óleos essenciais	6
2.2.1 Biossíntese de terpenos	7
2.2.2 Biossíntese de fenilpropanoides	11
2.3 Propriedades biológicas dos óleos essenciais.....	13
2.4 <i>Satureja montana</i> L.	15
2.5 <i>Myristica fragrans</i> Houtt.....	16
2.6 <i>Cymbopogon flexuosus</i>	18
2.7 Fungos.....	19
2.7.1 Micotoxinas - Gênero <i>Aspergillus</i>	20
2.7.2 <i>Aspergillus flavus</i>	24
2.7.3 <i>Aspergillus ochraceus</i>	25
2.8 Bactérias	27
2.8.1 <i>Escherichia coli</i>	27
2.8.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	29
2.9 Atividade antioxidante	30
2.10 Atividade repelente - <i>Rhipicephalus sanguineus</i> sensu lato	32
2.11 Inibição da enzima acetilcolinesterase	34
3. REFERÊNCIAS	36
SEGUNDA PARTE - ARTIGOS	50
ARTIGO 1 - AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE INIBIÇÃO DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE E DO EFEITO REPELENTE SOBRE <i>Rhipicephalus sanguineus</i> sensu lato DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>Satureja montana</i> L., <i>Myristica fragrans</i> H. E <i>Cymbopogon flexuosus</i>	51

1 - INTRODUÇÃO	53
2 - MATERIAL E MÉTODOS.....	54
3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4 – CONCLUSÃO.....	65
5 - REFERÊNCIAS	66
ARTIGO 2 - EFEITO BACTERICIDA E ANTIOXIDANTE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>Satureja montana</i> L., <i>Myristica fragrans</i> H. E <i>Cymbopogon flexuosus</i>	
1 - INTRODUÇÃO	72
2 - MATERIAL E MÉTODOS.....	73
3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
4 - CONCLUSÃO	86
5 - REFERÊNCIAS	87
ARTIGO 3 - EFEITO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>Satureja montana</i> L., <i>Myristica fragrans</i> H. E <i>Cymbopogon flexuosus</i> SOBRE FUNGOS <i>Aspergillus flavus</i> e <i>Aspergillus ochraceus</i> PRODUTORES DE MICOTOXINAS	
1 - INTRODUÇÃO	93
2 - MATERIAL E MÉTODOS.....	94
3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	99
4 – CONCLUSÃO.....	106
5 - REFERÊNCIAS	108

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

Figura 1 - Rotas da biossíntese de metabólitos secundários.....	6
Figura 2 - Biossíntese de terpenos – Via Mevalonato	9
Figura 3 - Biossíntese de terpenos – Via DXPS.....	10
Figura 4 - Biossíntese de fenilpropanoides.....	12
Figura 5 - Aspecto geral de <i>Satureja montana</i> L.....	16
Figura 6 - Aspecto geral de <i>Myristica fragrans</i> H.....	17
Figura 7 - Aspecto geral de <i>Cymbopogon flexuosus</i>	18
Figura 8 - Estrutura química da Ocratoxina A.	22
Figura 9 - Estrutura química da Aflatoxina B1.	22
Figura 10 - Estrutura química da Aflatoxina B2.	22
Figura 11 - <i>Aspergillus flavus</i>	24
Figura 12 - <i>Aspergillus ochraceus</i>	26
Figura 13 - <i>Escherichia coli</i>	28
Figura 14 - <i>Staphylococcus aureus</i>	29

ARTIGO 1

Figura 1 - Porcentagens de atividade enzimática para os óleos essenciais de <i>Satureja montana</i> L., <i>Myristica fragrans</i> H. e <i>Cymbopogon flexuosus</i>	61
Figura 2 - Porcentagens de repelência em diferentes concentrações observadas para os óleos essenciais de <i>S. montana</i> L., <i>M. fragrans</i> H. e <i>C. flexuosus</i> sobre <i>R. sanguineus</i> sensu lato...	63
Figura 3 - Porcentagens de repelência em concentração constante observadas para os óleos essenciais de <i>Satureja montana</i> L., <i>Myristica fragrans</i> H. e <i>Cymbopogon flexuosus</i> em diferentes tempos sobre <i>Rhipicephalus sanguineus</i> sensu lato.	64

ARTIGO 2

Figura 1- Cromatogramas da identificação e quantificação dos óleos essenciais.	78
Figura 2 - Eletromicrografias de varredura de <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> ; A, B, C e D são eletromicrografias de <i>S. aureus</i> sem tratamento e tratados com óleos essenciais de <i>S. montana</i> , <i>M. fragrans</i> e <i>C. flexuosus</i> , respectivamente; A', B', C' e D' são eletromicrografias de <i>E. Coli</i> sem tratamento e tratados com óleos essenciais de <i>S. montana</i> , <i>M. fragrans</i> e <i>C. flexuosus</i> , respectivamente.....	81
Figura 3 – Comportamento do antioxidante BHT e dos óleos essenciais de <i>S. montana</i> , <i>M. fragrans</i> e <i>C. flexuosus</i> na estabilização de radicais DPPH (A) e no ensaio de branqueamento de β -caroteno (B).....	82
Figura 5 – Poder redutor, efeito da concentração na variação da absorbância no comprimento de onda 700 nm.	84

ARTIGO 3

Figura 1 - Efeito dos óleos essenciais na inibição do crescimento micelial das espécies <i>A. flavus</i> e <i>A. ochraceus</i>	99
Figura 2 - Eletromicrografias de varredura de <i>A. flavus</i> e <i>A. ochraceus</i> ; A, B, C e D são eletromicrografias de <i>A. flavus</i> sem tratamento e tratados com óleos essenciais de <i>S. montana</i> , <i>M. fragrans</i> e <i>C. flexuosus</i> , respectivamente; A', B', C' e D' são eletromicrografias de <i>A. ochraceus</i> sem tratamento e tratados com óleos essenciais de <i>S. montana</i> , <i>M. fragrans</i> e <i>C. flexuosus</i> , respectivamente	104

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1 - Teor de umidade e rendimento dos óleos essenciais de <i>S. montana</i> L., <i>M. fragrans</i> H. e <i>C. flexuosus</i>	58
Tabela 2 - Composição dos óleos essenciais de <i>S. montana</i> L., <i>M. fragrans</i> H. e <i>C. flexuosus</i>	59
Tabela 3 - Valores de IC ₅₀ para a inibição de acetilcolinesterase.	61
Tabela 4 - Índices de repelência em diferentes concentrações dos óleos essenciais de <i>S. montana</i> L., <i>M. fragrans</i> H. e <i>C. flexuosus</i> sobre <i>R. sanguineus sensu lato</i>	63
Tabela 5 - Índices de repelência em concentração constante dos óleos essenciais de <i>S. montana</i> L., <i>M. fragrans</i> H. e <i>C. flexuosus</i> em diferentes tempos sobre <i>R. sanguineus sensu lato</i>	64

ARTIGO 2

Tabela 1 – Concentração mínima inibitória e mínima bactericida dos óleos essenciais frente à <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	79
Tabela 2 - Valores de IC ₅₀ para o método de sequestro de radicais DPPH• e branqueamento do β-caroteno.	83

ARTIGO 3

Tabela 1 - Efeito dos óleos essenciais na produção de ocratoxina A de <i>A. ochraceus</i>	100
Tabela 2 - Efeito dos óleos essenciais na síntese de ergosterol das espécies <i>A. flavus</i> e <i>A. ochraceus</i>	102

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Classificação das micotoxinas.	23
Quadro 2 Limites de toxinas em produtos de acordo com a Resolução-RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011.	24

PRIMEIRA PARTE

1. INTRODUÇÃO GERAL

Doenças infecciosas são causadas por microrganismos patogênicos, vírus, fungos e bactérias, apoderando-se de um hospedeiro sensível, como seres humanos e/ou animais, provocando as infecções. O aumento de surtos nos últimos anos adverte a extensão do problema, ou seja, tal fato mostra que as doenças infecciosas não estão desaparecendo, pelo contrário, parecem estar aumentando cada vez mais. As doenças infecciosas se desenvolvem devido a vários fatores, e como resultado da seleção natural, tem-se a resistência antimicrobiana (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017). *Staphylococcus aureus* é um patógeno que está presente em células epiteliais nasais de seres humanos e, assim como *Escherichia coli*, este também é inofensivo. No entanto, a utilização inadequada de antibióticos permite a sobrevivência de algumas bactérias que apresentam resistência a antibióticos. Embora o desenvolvimento e a comercialização dos antimicrobianos sejam elevados, observa-se uma crescente resistência de microrganismos a essas substâncias e/ou princípio ativo (TAYLOR; UNAKAL, 2017).

Os carrapatos também se destacam como importantes transmissores de patógenos de importância médica e veterinária. *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato, o carrapato vermelho-do-cão, destaca-se dentre os membros da família Ixodidae por sua extensa distribuição mundial e por transmitir diversos patógenos tanto para o homem quanto para os canídeos (GUGLIELMONE et al., 2014). Esses parasitos se fixam no hospedeiro e permanecem ali por vários dias. A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima regulatória responsável pela finalização da transmissão dos impulsos nervosos nas sinapses de vertebrados e invertebrados, por meio da hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh); essa é uma função chave na regulação da transmissão dos impulsos nervosos, pois sua inibição geralmente leva rapidamente à morte do organismo (ALBUQUERQUE et al., 2006; PATOCKA et al., 2005). A AChE é alvo de pesticidas organofosforados e carbamato no controle de pragas. Devido ao uso indiscriminado de pesticidas, ocorre a seleção de muitos parasitos resistentes (LEE et al., 2015). Diante disso, torna-se necessária a busca por novas substâncias com potencial acaricida e inseticida, sendo os inibidores da AChE compostos de grande potencial biocida em insetos e carrapatos.

As substâncias antioxidantes são de extrema importância, pois mesmo em pequenas concentrações, conseguem impedir ou retardar a velocidade da oxidação daquele produto que as contém (alimentos, cosméticos, fármacos, etc.). Essas substâncias também podem inibir ou

diminuir os efeitos causados pelos radicais livres e compostos oxidativos presentes em substratos oxidáveis. Radicais livres são espécies instáveis e extremamente reativas; por isso, a produção equilibrada de radicais livres é muito importante, pois estão envolvidos na produção de ATP, fagocitose e regulação do crescimento celular. Logo, a produção desequilibrada de radicais livres no organismo causa dano oxidativo em células e tecidos, e esses prejuízos estão diretamente ligados a diversas patologias, incluindo o câncer, doenças cardiovasculares e doenças neurodegenerativas (ABRAHÃO et al., 2010; PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Satureja montana, *Myrtica fragrans* e *Cymbopogon flexuosus* são plantas pertencentes às famílias, Lamiaceae, Myristicaceae e Poaceae, respectivamente. Na composição dos óleos essenciais, são encontrados diferentes constituintes, dentre os quais podem-se citar os terpenos, terpenoides e fenilpropanoides (BAKKALI et al., 2008). Os óleos essenciais, compostos provenientes do metabolismo secundário de plantas, apresentam diversas propriedades ecotoxicológicas favoráveis. Além de atividades antioxidantes, antimicrobianas, repelentes e acaricidas, são inibidores de toxinas e da acetilcolinesterase. São compostos por substâncias de baixa toxicidade para seres humanos e o meio ambiente, com capacidade de degradação adicional e o custo geralmente reduzido devido à grande abundância (TAK; ISMAN, 2017; JIA et al., 2018). Os óleos essenciais são definidos como substâncias orgânicas voláteis e lipofílicas, geralmente apresentam características odoríferas e podem ser incolores ou ligeiramente amarelados (OTONI et al., 2016).

Estudos com produtos naturais vêm aumentando cada vez mais, além de serem menos agressivos ao meio ambiente, sendo consideradas alternativas promissoras, uma vez que são produtos obtidos de plantas.

Assim, objetivou-se neste estudo extrair e caracterizar quimicamente os óleos essenciais das três espécies de plantas; *S. montana* L., *M. fragrans* H. e *C. flexuosus*, bem como avaliar as atividades antioxidantes, bactericida, fungicida, inibição de ocratoxina A, aflatoxina, síntese de ergosterol e repelente, efeito inibitório sobre acetilcolinesterase e avaliar o efeito dos óleos essenciais na morfologia de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* e de fungos do gênero *Aspergillus*, por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Metabólitos secundários das plantas

As plantas possuem dois tipos de metabolismo: primário e secundário. O metabolismo primário é responsável pela síntese de macromoléculas que possuem função estrutural, plástica e de armazenamento de energia. Exemplos são os lipídios, carboidratos, proteínas, ácidos nucleicos, celulose, lignina, açúcares e outras substâncias importantes para a realização das funções vitais. Por outro lado, o metabolismo secundário não tem participação direta no metabolismo essencial, mas garante vantagens para a sobrevivência de sua espécie em seu habitat (OOTANI et al., 2013).

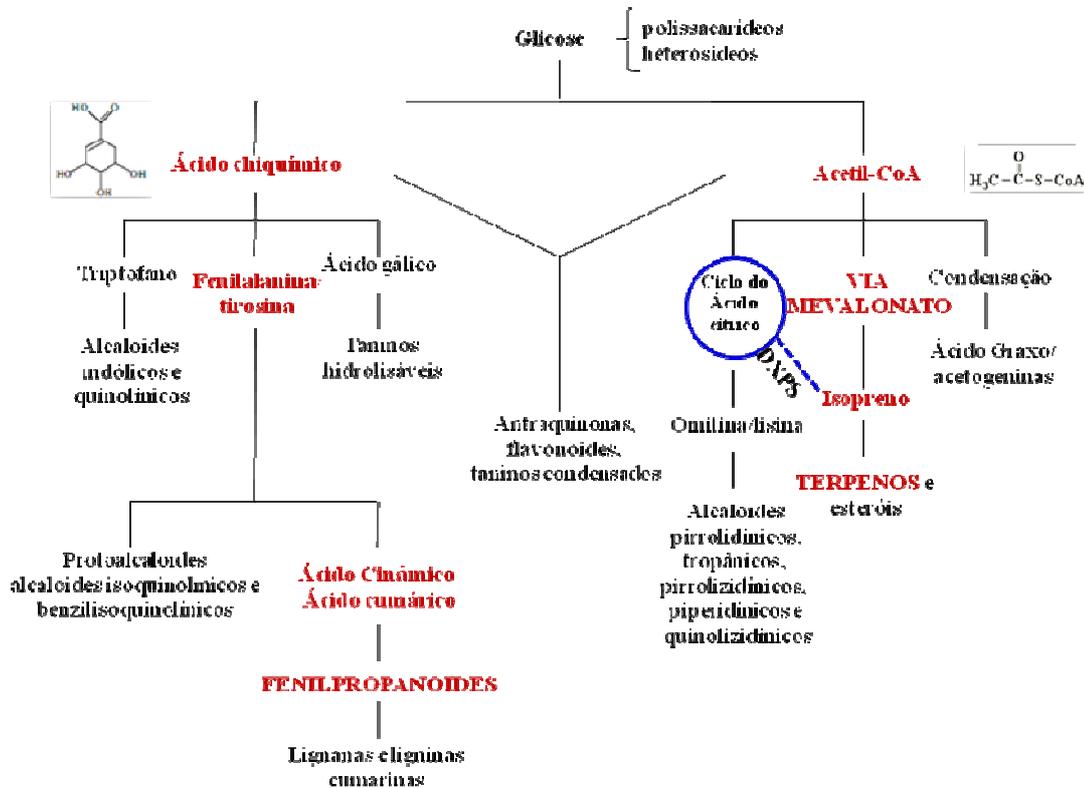
Metabólitos secundários são substâncias produzidas em resposta a diversos fatores ambientais e são exclusivos a uma espécie ou a um grupo de espécies com características semelhantes. A síntese de metabólitos secundários é uma estratégia química das plantas, pois possibilita sua sobrevivência como forma de proteção, atração de polinizadores, adaptações ao estresse ambiental ou mesmo para sua defesa contra microrganismos e insetos, favorecendo assim seu desenvolvimento (DELORY et al., 2016).

Todo conjunto de transformações das moléculas orgânicas que ocorrem sucessivamente em cada célula é conhecido como metabolismo. Essas transformações são reações catalisadas por enzimas, que ocorrem nas células vivas, suprindo o organismo de energia, renovando suas moléculas e garantindo a sua continuidade. Essas reações são direcionadas por enzimas específicas, estabelecendo, assim, as rotas metabólicas (MARZZOCO; TORRES, 2007).

Os metabólitos secundários geralmente apresentam estrutura complexa, baixo peso molecular e possuem atividades biológicas importantes, estando presentes em baixas concentrações e grupos específicos de plantas. No passado, já foram considerados como produtos de excreção do vegetal (BERG; LUBERT, 2008).

A formação dos metabólitos secundários pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose, que origina dois intermediários principais: o ácido chiquímico e a acetil-CoA, como mostrado na Figura 1:

Figura 1 - Rotas da biossíntese de metabólitos secundários.



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

Os compostos originados do ácido chiquímico são aminoácidos aromáticos como fenilalanina e tirosina, que são precursores da maioria dos metabólitos secundários aromáticos, como taninos hidrolisáveis e condensados, cumarinas, alcalóides e fenilpropanóides. Os derivados do acetil-CoA, aminoácidos alifáticos, terpenóides e ácidos graxos são originados pela via do ciclo do ácido cítrico, via mevalonato e condensação do acetil-CoA, respectivamente. Alguns metabólitos são resultantes da combinação do ácido chiquímico e acetil-CoA, essa que resulta em antraquinonas, flavonóides e taninos condensados. Esses compostos apresentam alto valor comercial, não apenas em indústria farmacêutica, mas alimentícia, agrônômica e de perfumaria. (TAIZ; ZEIGER, 2013).

2.2 Óleos essenciais

Os óleos essenciais apresentam uma estrutura química geralmente complexa, são substâncias orgânicas voláteis e lipofílicas, geralmente apresentam características odoríferas e são incolores ou ligeiramente amarelados, com exceção dos óleos essenciais que apresentam

alto teor de azuleno, como o de camomila, mil-folhas e arnicão, pois apresentam coloração azulada. Óleos essenciais são normalmente encontrados, em pequenas quantidades, em glândulas específicas denominadas tricomas, exibem elevada volatilidade, instabilidade na presença de luz, oxigênio, substâncias oxidantes e redutoras, em meios com pH extremos, ou na presença de traços de metais que podem catalisar reações de decomposição e transformação (SIMÕES et al., 2007).

De acordo com a International Organization for Standardization (ISO), óleos essenciais podem ser extraídos a partir de um grande número de plantas por diferentes técnicas, como hidrodestilação, arraste a vapor d'água, e também pela prensagem do pericarpo de frutos cítricos. Óleos essenciais são substâncias que podem ser encontradas em diferentes órgãos da planta, como raízes, rizomas, folhas, flores, sementes, dentre outros; são encontrados também em diferentes estruturas secretoras, como em canais oleíferos, pelos glandulares, bolsas lisígenas e células parenquimáticas diferenciadas (SIMÕES et al., 2007).

Os óleos essenciais podem ser formados por hidrocarbonetos terpênicos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, compostos com enxofre, fenóis, álcoois, cetonas, aldeídos, ésteres, óxidos, etc., todos com suas características e particularidades. Essa complexidade pode explicar em partes porque um determinado óleo pode agir como um antifúngico e ao mesmo tempo atuar como antidepressivo e calmante, além de ser empregado em indústrias de cosmetologia e alimentícia (BAKKALI et al., 2008).

A composição do óleo essencial varia consideravelmente em função da localização geográfica e idade da planta, clima, solo, altitude, sazonalidade, período (noite ou dia), etc. Essas variáveis podem influenciar também a concentração dos seus constituintes, alguns são encontrados em maiores proporções, são os componentes majoritários, e outros em menores, conhecidos como componentes minoritários. Apesar da complexidade na constituição dos óleos essenciais, eles são formados por fenilpropanoides e/ou terpenos, sendo esses últimos predominantes na forma de monoterpenos e sesquiterpenos (DEWICK, 2009).

2.2.1 Biossíntese de terpenos

Os terpenos são classificados de acordo com o número de unidades isoprênicas. Moléculas com 10 átomos de carbono apresentam duas unidades isoprênicas e são denominadas monoterpenos, com 15 átomos de carbono apresentam três unidades isoprênicas

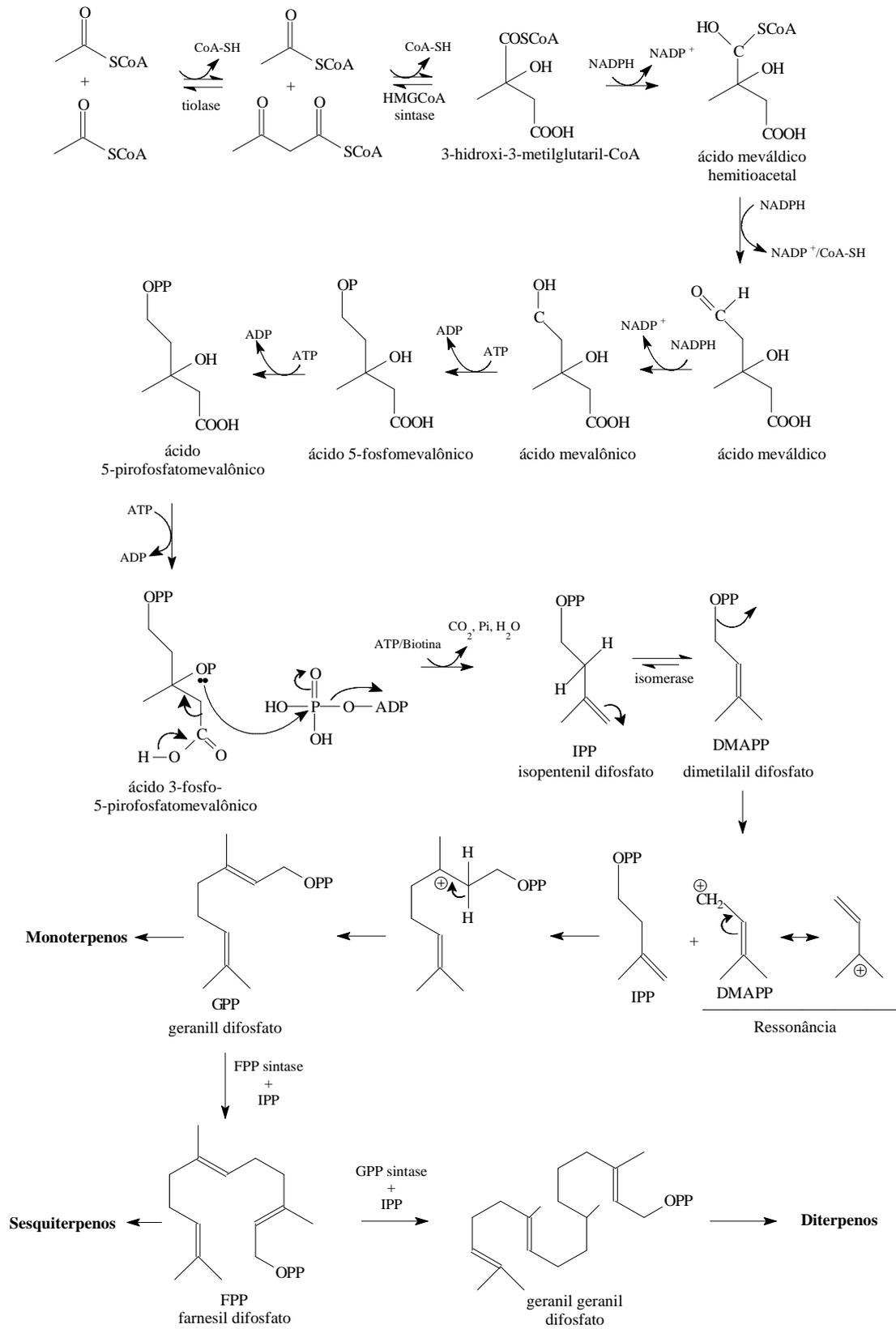
e são os sesquiterpenos e com 20 átomos de carbono apresentam 4 unidades isoprênicas e são os diterpenos (BAKKALI et al., 2008).

Na constituição dos óleos, também podem ser encontrados os terpenoides, que são terpenos que apresentam em sua estrutura outro elemento, por exemplo, o oxigênio. São conhecidos mais de 36.000 terpenoides diferentes, e essa diversidade é atribuída a diferenciadas estruturas e grupos funcionais (LÜCKER, 2002).

Terpenos são formados a partir de dois intermediários básicos, o IPP (isopentenil difosfato) e o DMAPP (dimetilalil difosfato) e representam uma grande variedade de substâncias presentes em vegetais (SIMÕES et al., 2007).

Os terpenos são biossintetizados por duas rotas distintas, a partir de metabólitos primários. Pela via do mevalonato (no citosol) (FIGURA 2), três moléculas de acetil-CoA são ligadas por uma série de reações, formando o ácido mevalônico, um importante intermediário, que após ser formado, será pirofosforilado, descarboxilado e desidratado, produzindo assim o isopentenil difosfato (IPP), unidade básica para a formação dos terpenos, que posteriormente sofre reação de isomeria, interconverte-se em dimetilalil difosfato (DMAPP). A junção do IPP e do seu isômero DMAPP forma terpenos maiores (monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos) tendo como intermediário o geranyl difosfato (GPP, C10) (DEWICK, 2009).

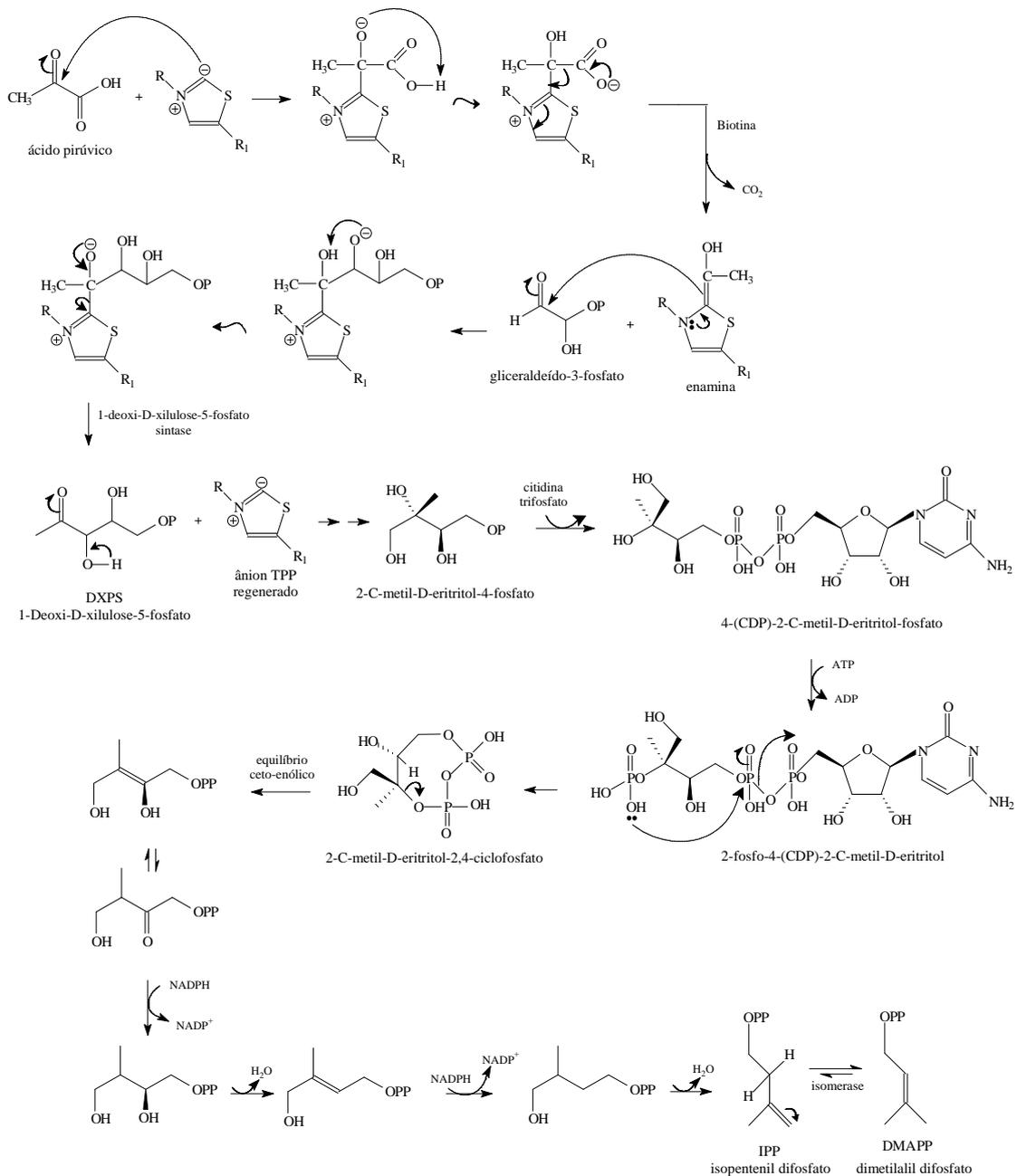
Figura 2 - Biossíntese de terpenos – Via Mevalonato.



Fonte: Adaptado de DEWICK, 2009.

O precursor IPP também pode ser formado pela via DXPS (FIGURA 3), síntese que ocorre nos plastídios. Os compostos terpênicos (IPP e DMAPP) sintetizados em ambas as rotas (melavonato e DXPS) podem ser modificados por vários tipos de reações, assim serão originados diferentes monoterpenos, os quais representam 90% da composição da grande maioria dos óleos essenciais (BAKKALI et al., 2008; DEWICK, 2009).

Figura 3 - Biossíntese de terpenos – Via DXPS.

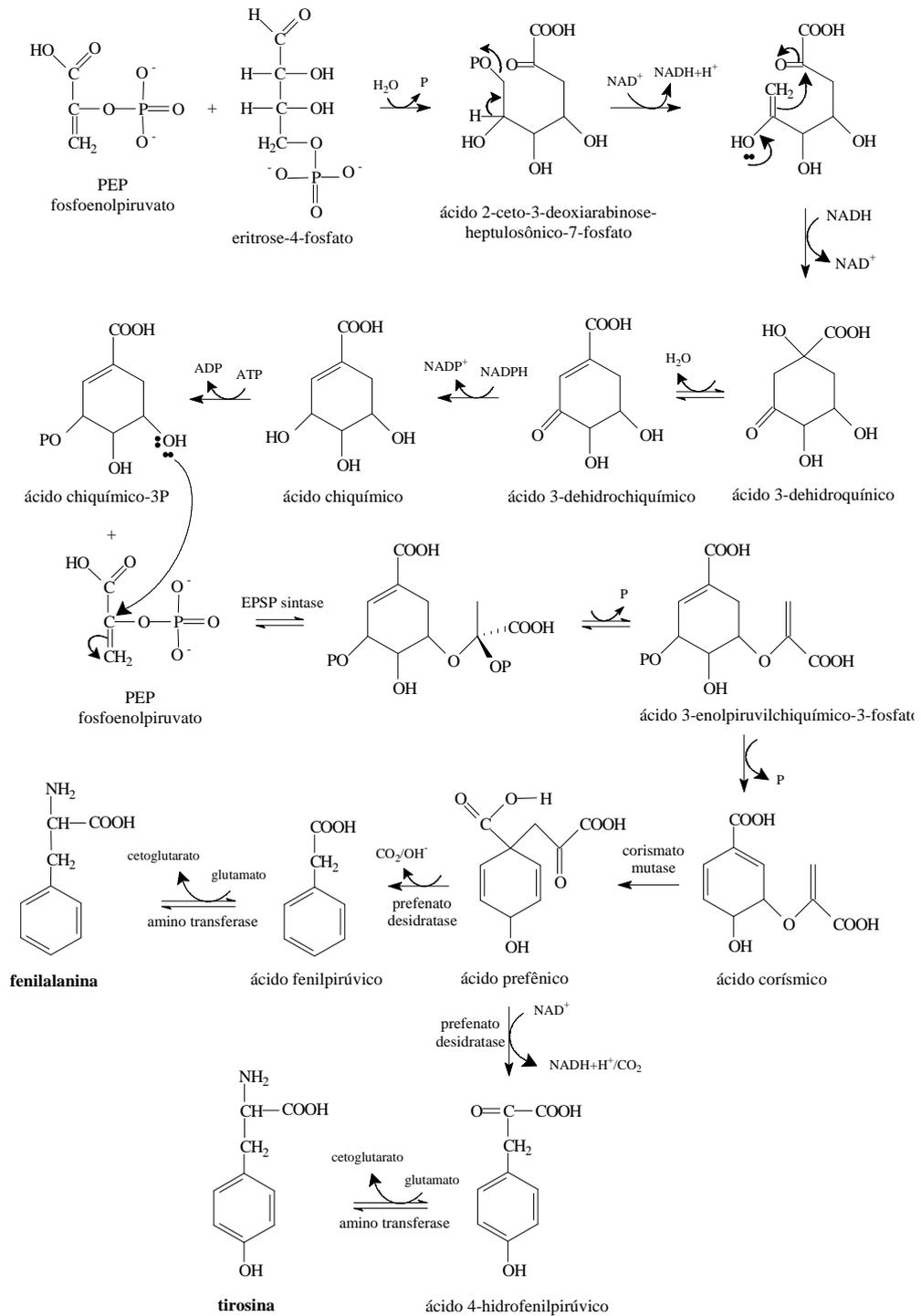


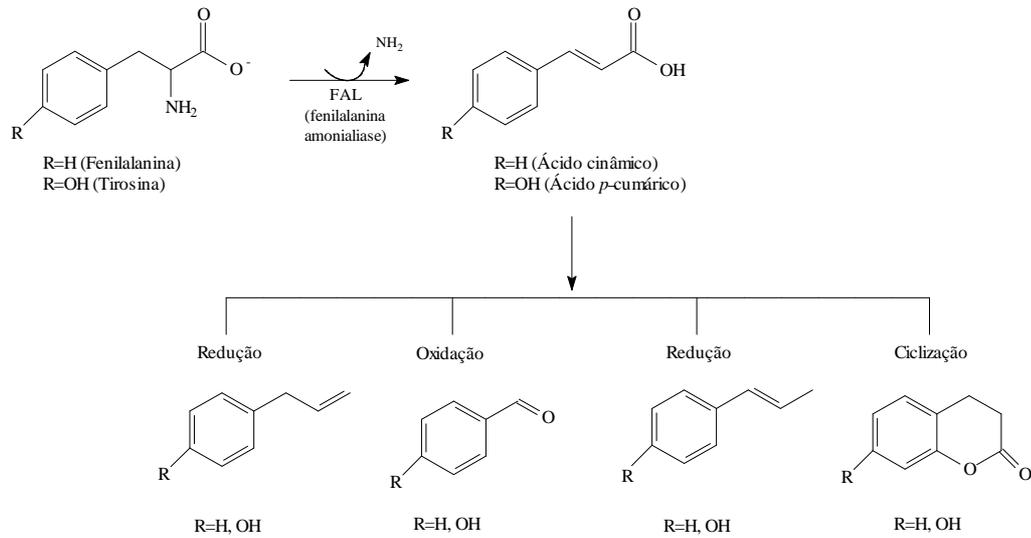
Fonte: Adaptado de DEWICK, 2009.

2.2.2 Biossíntese de fenilpropanoides

Os fenilpropanoides são compostos menos abundantes do que os terpenoides. Além disso, apresentam em sua estrutura um anel benzênico com uma cadeia lateral composta por três átomos de carbono e com uma dupla ligação, e podem apresentar uma hidroxila na posição *para*. Fenilpropanoides são formados a partir do ácido chiquímico, que é um precursor formado pela condensação aldólica de dois metabólitos da glicose, o fosfoenolpiruvato e a eritrose-4-fosfato. A junção de uma molécula de ácido chiquímico e uma de fosfoenolpiruvato forma o ácido corísmico, responsável por originar os aminoácidos fenilalanina e tirosina. A ação da enzima fenilalanina amonialiase (FAL) implica a formação dos ácidos cinâmico e *p*-cumárico. Assim, por meio de reações de redução, oxidação e ciclização desses ácidos, diferentes fenilpropanoides são formados (FIGURA 4) (SIMÕES et al., 2007).

Figura 4 - Biossíntese de fenilpropanoides.





Fonte: Adaptado de SIMÕES et al., 2007.

2.3 Propriedades biológicas dos óleos essenciais

As plantas são utilizadas desde a antiguidade para fins alimentares e medicinais. Produtoras de metabólitos secundários, as plantas, na maioria das vezes, os produzem como forma de defesa e preservação (SIMÕES et al., 2007). Os óleos essenciais, conhecidos como óleos voláteis, são metabólitos secundários presentes em diferentes estruturas das plantas, possuem odor característico, apresentam-se na forma líquida e são instáveis em diversas condições. São constituídos, geralmente, por dezenas de moléculas químicas, que se agrupam de maneira característica para cada óleo essencial, sendo responsáveis por diversas atividades biológicas, podendo atuar como aleloquímicos, protetores contra certos patógenos, como bactérias, fungos e vírus, além de possuírem ações antioxidantes (SIMÕES et al., 2007).

O potencial biológico dos óleos essenciais é reconhecido há décadas e pode ser derivado do efeito individual dos constituintes majoritários ou efeito sinérgico dos componentes (SIMÕES et al., 2007).

Os óleos essenciais apresentam diversas atividades biológicas. Segundo Teixeira et al. (2018) e Rezende et al. (2017a), alguns óleos essenciais são inibidores de fosfolipase A₂, outros apresentam efeito pró-coagulante quando incubado com plasma humano citratado. Também apresentam potencial fungicida sobre *Colletotrichum truncatum*, *Fusarium graminearum* e *Drechslera oryzae* (SILVA et al., 2015), além de apresentarem ação inibitória sobre *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Choleraesuis* e *Escherichia coli* (REZENDE et al.,

2017b). Também proporcionam efeito genotóxico, sendo assim considerados promissores para formulações farmacêuticas alternativas, devido às opções limitadas de quimioterapia atualmente disponíveis (SILVA et al., 2017a). O óleo essencial de *Foeniculum vulgare* (erva-doce), por exemplo, também se mostrou eficaz diante de bactérias patogênicas como *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* e *Shigella dysenteriae*. O mesmo óleo também pode ser considerado um agente anticancerígeno muito potente contra linhagens celulares de câncer de mama humano (MDA-Mb) e carcinoma epitelioide cervical (Hela) pelo ensaio MTT com IC₅₀ menor que 10 µg/mL em ambos os casos (AKHBARI et al., 2019).

Tais propriedades vêm sendo cada vez mais exploradas pelos diferentes ramos industriais, destacando-se as indústrias farmacêuticas, devido às suas propriedades antissépticas, digestivas, sedativas e analgésicas; indústrias de cosméticos, atuando como base para sabonetes, cremes e perfumes (EL ASBAHANI et al., 2015) e têm sido considerados como alternativas promissoras no controle de pragas agrícolas em geral, além de repelentes no controle de carrapatos devido à grande variedade de espécies de plantas, baixo custo e grande abundância (BENELLI et al., 2016).

Dalziel (1937) e Ajayi et al. (2019) mostraram que os óleos essenciais também podem estar relacionados com a inibição de AChE. Sugerem que alguns óleos essenciais podem ser capazes de reduzir o dano oxidativo às células, melhorando as condições inflamatórias. A maioria dos inibidores da AChE com potencial são alcaloides (ZANGARA, 2003; HAMANN et al., 2007); no entanto, metabólitos secundários de plantas com diferentes características estruturais, como esteróis, terpenoides, flavonoides e compostos fenólicos, também foram reconhecidos como inibidores da AChE e considerados compostos promissores (MURRAY et al., 2013).

O óleo essencial de *Illicium verum* Hook. F. (anis estrelado), segundo pesquisas realizadas por Luís et al. (2019), mostraram a capacidade de eliminar radicais livres, inibir a peroxidação lipídica e inibir a desnaturação da proteína. Tais potenciais estão associados às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias.

Segundo dados publicados por Bouyahya et al. (2019), o óleo essencial de *Centaurea erythraea*, coletada no noroeste do Marrocos em três estágios de desenvolvimento (estágio vegetativo, estágio de florescimento e estágio pós-floração), exibiu forte atividade antidiabética, inibindo a α -amilase e α -glicosidase. Os mesmos autores observaram também uma forte inibição da tirosinase, podendo ser usado como dermatoprotetor.

2.4 *Satureja montana* L.

Satureja montana está entre as 200 espécies pertencentes à família Lamiaceae, que são nativas de regiões temperadas quentes, como Oriente Médio, Mediterrâneo, Europa, Ásia Ocidental e norte da África. Plantas pertencentes ao gênero *Satureja* são utilizadas tradicionalmente para o tratamento de doenças e suas complicações, pois muitas dessas espécies apresentam diferentes potenciais biológicos, como antimicrobiano (HALOC et al., 2016; FALSAFI et al., 2015; LABIOD; AOUADI; BOUHADDOUDA, 2015; SADEGHI et al., 2013;), antioxidante (HASSANEIN; AHL HAH; ABDELMOHSEN, 2014; LÓPEZ-COBO et al., 2015; NAJAFI et al., 2016), efeito diurético (STANIC; SAMARZIJA, 1993), efeito cardiovascular (YAZDANPARAST; SHAHRIYARY, et al., 2008), atividade gastrointestinal (CRUZ et al., 1990; HAJHASHEMI et al., 2000), hepatoprotetora (AKDOGAN et al., 2014; ASSAEI et al., 2014), antiviral (VITURRO et al., 2000; YAMASAKI et al., 1998), antiinflamatória (ESMAEILI et al., 2015; ZEIDAN-CHULIA et al., 2015), efeitos tripanocida e antiprotozoário (CETIN et al., 2010; DUKE; BECKSTORM-STEMBERG, 2001), anticancerígeno e efeitos citotóxicos (ELGNDI et al., 2017; GOHARI et al., 2012; SADEGHI et al., 2013;), atividade anticolinesterásica (AKDOGAN et al., 2014). Esses potenciais se confirmam devido a seu importante desempenho nas indústrias farmacêuticas (JAFARI; GHAVIDEL; ZARSHENAS, 2016; TEPE; CILKIZ, 2016).

O óleo essencial de espécies de *Satureja* possui variadas propriedades, isso o torna promissor em diferentes áreas, como agentes de sabor na indústria de processamento de alimentos e cosméticos (LEREBOUR; LARTAUD; LACTROIX, 2016, OLIVEIRA et al., 2011), substitutos de inseticidas, fungicidas, bactericidas e nematicidas sintéticos para proteção de plantas e contra pragas domésticas (CHANTRAINE et al., 1998; PICARD et al., 2012; SARKHOSH et al., 2018; TOZLU et al., 2011), conservantes naturais, agentes de conservação em indústrias de alimentos e cosméticos, ingredientes ativos na medicina, dentre outras (CHORIANOPOULOS et al., 2004).

S. montana é comumente conhecida como segurelha de inverno ou segurelha montanhesa (FIGURA 5). Por apresentar aroma forte e característico, essa erva aromática tem sido constantemente usada na culinária mediterrânea, como chás, temperos para carnes e peixes, e em agentes aromatizantes para sopas, salsichas, carnes enlatadas e molhos, bem

como erva medicinal tradicional (JAFARI; GHAVIDEL; ZARSHENAS, 2016; OLIVEIRA et al., 2011; SILVA et al., 2009).

Figura 5 - Aspecto geral de *Satureja montana* L.



Fonte: Do autor, 2019.

A composição do óleo essencial de *S. montana* pode variar consideravelmente. Para Silva et al. (2015), timol (32,85%), carvacrol (14,35%), p-cimeno (12,12%) e linalol (8,99%) foram os majoritários encontrados. Sojic et al. (2019) mostraram um resultado diferente, uma vez que os autores não encontraram os mesmos constituintes nem quantidades similares, sendo carvacrol (59,16%), p-cimeno (6,48%) encontrando apenas 0,8% de timol. Vitanza et al. (2019) também encontraram carvacrol (43,9%) como majoritário seguido de p-cimeno (15,3%) e timol (7,6%). Benelli et al. (2017) encontraram os mesmos majoritários carvacrol (22,4%), p-cimeno (18,9%) e timol (18,8%); no entanto, as porcentagens ficaram bem próximas entre eles.

Apesar da variabilidade da composição química do óleo essencial de *S. montana* em função de diversos fatores, como as características ambientais e genéticas da planta, o óleo essencial é geralmente reconhecido pelas suas propriedades antibacterianas, fungicidas, antivirais e antioxidantes (SKOCIBUSIC; BEZIC, 2004).

2.5 *Myristica fragrans* Houtt.

Myristica fragrans Houtt., popularmente conhecida como noz-moscada (FIGURA 6), pertence à família Myristicaceae. É uma planta que apresenta um alto valor econômico, sendo a Indonésia a maior produtora e fornecedora de noz-moscada, responsável por 80% da produção mundial (RODIANAWATI et al., 2015).

Figura 6 – Aspecto geral de *Myristica fragrans* Houtt.



Fonte: Do autor, 2019.

A noz-moscada é uma planta aromática que apresenta uma variedade de fitoquímicos ativos, incluindo vitaminas, carotenoides, terpenoides, alcaloides, flavonoides, lignanas e fenólicos, etc (GUPTA et al., 2013). A noz-moscada é amplamente utilizada na indústria alimentícia, pois apresenta efeitos antioxidantes, antimicrobianos, citotóxicos, anti-inflamatórios e anticancerígenos (JIN et al., 2012; OLAJIDE et al., 1999; PHUONG THIEN et al., 2014), antitrombóticos e antimicrobianos (NARASIMHAN; DHAKE, 2006). Pillai et al. (2012) relataram posteriormente as propriedades antiparasitárias e também efeitos da noz-moscada em larvas de *Anisakis simplex* (LÓPEZ et al., 2015; OISHI; MORI; NISHIURA, 1974).

De acordo com Nascimento et al. (2005), diversas propriedades farmacológicas, como anti-inflamatória, antimicrobiana, antiprotozoária e potencial anticâncer, podem ser em função do composto terpen-4-ol presente no óleo essencial de *M. fragrans*. Gupta et al. (2013) e posteriormente Soni et al. (2016) encontraram no óleo essencial de *M. fragrans* componetes, como α -pineno, β -pineno, α -tujeno, p-cimeno, limoneno, γ -terpinoleno, linalol, α -terpineol, eugenol, miristicina, elemicina, sabineno, terpen-4-ol e γ -terpineno (GUPTA et al., 2013; LIMA et al., 2012; SONI, SHARMA; JASUJA, et al., 2016). Essa espécie pode apresentar um elevado rendimento de óleo essencial, podendo chegar a 13,61% de acordo com Rodianawati et al. (2015).

2.6 *Cymbopogon flexuosus*

O gênero *Cymbopogon* é composto por espécies produtoras de óleos essenciais de grande importância comercial e na formulação de medicamentos alternativos (KIRTIKAR et al., 1986). *Cymbopogon flexuosus* é uma planta herbácea pertencente à família Poaceae, conhecida popularmente como capim-indiano ou capim-limão da Índia Oriental (FIGURA 7). É uma espécie nativa da Índia e seu óleo essencial é amplamente utilizado em indústrias por apresentar propriedades antimicrobianas (ADUKWU et al., 2016; AZEVEDO et al., 2016; COSTA et al., 2017; KARADAS et al., 2014), antibiofilme (GÜNDEL et al., 2018), acaricida (AGNOLIN et al., 2014), antiinflamatória (JIANG et al., 2016), antioxidantes (COSTA et al., 2017; JIANG et al., 2016), inseticidas, larvicidas e antitumoral e citotóxica (GAONKAR et al., 2018; SHARMA et al., 2009). Acredita-se também que o óleo de *C. flexuosus* auxilie com distúrbios relacionados ao estresse (CHAO et al., 2000) e alergias (MITOSHI et al., 2014).

Figura 7 – Aspecto geral de *Cymbopogon flexuosus*.



Fonte: Do autor, 2019.

O óleo essencial de capim-limão (*C. flexuosus*) tem como principal constituinte o citral (até 85% do óleo), formado por dois isômeros, neral e geranial, que conferem o aroma de limão e as propriedades medicinais à planta (DESAI; PARIKH, 2012).

C. flexuosus e *C. citratus* são plantas conhecidas pelo mesmo nome comum (capim-limão), e apresentam em sua composição o majoritário citral (GANJEWALA, 2009). Na

composição do óleo essencial de *C. flexuosus* também podem ser encontrados compostos como geraniol, acetato de geranila e bisabolol, que isoladamente conferem o potencial citotóxico às células cancerígenas (CAVALIERI et al., 2004), além do linalol, 1,8-cineol, 4-nonanona, cariofileno, α -muuroleno (GÜNDEL et al., 2018). O limoneno e o borneol presentes no óleo essencial de *C. flexuosus* se destacam por sua atividade imunoestimuladora, atividades analgésica e anestésica (TORO-ARREOLA et al., 2005; GRANGER et al., 2005).

2.7 Fungos

O Reino Fungi apresenta um enorme número de espécies. Os fungos são microrganismos eucarióticos, multicelulares ou unicelulares e filamentosos, que podem causar alterações no sabor, segurança e qualidade de alimentos, trazendo riscos à saúde humana e animal devido à produção de micotoxinas (OLIVEIRA et al., 2013).

O aumento de doenças causadas por fungos desafia os profissionais de saúde em todo o mundo, os quais geralmente se adaptam a ambientes que podem ser inóspitos para bactérias. Normalmente crescem em ambientes com pH entre 5-6, são quase todos filamentosos, resistentes à pressão osmótica e, por isso, podem crescer em concentrações relativamente altas de sal ou açúcar. Também podem se desenvolver em lugares ou substâncias com baixo grau de umidade. Tais características permitem que os fungos se desenvolvam em lugares improváveis, como paredes de banheiro, couro de sapatos e jornais velhos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

As condições mais favoráveis para o desenvolvimento e proliferação fúngica não são as mais favoráveis para a produção de micotoxinas. Os fungos produzem micotoxinas em circunstâncias específicas e é parte da estratégia do fungo para se proteger das agressões do meio em situações de estresse. Assim, mesmo após a morte dos fungos, por serem termo estáveis, permanecem por longos períodos no substrato (NOVINSKY, 2013) e são carregadas para outros ingredientes ou componentes derivados de processamento industrial (COPETTI, 2009; LEITE, 2010).

2.7.1 Micotoxinas - Gênero *Aspergillus*

Entre os vários fungos conhecidos capazes de produzir micotoxinas, o gênero *Aspergillus* pode ser encontrado em todo tipo de ambiente. Diversas espécies de *Aspergillus* são consideradas patogênicas e toxicogênicas, pois além de causar doenças em humanos, animais e vegetais, colonizando-os, também liberam substâncias tóxicas ao redor da área colonizada. Esse gênero se destaca por ser um importante produtor de micotoxinas no reino Fungi. Essas micotoxinas podem contaminar alimentos de consumo humano e animal e podem aparecer no campo antes da colheita, pós-colheita ou durante o processamento e armazenamento, comprometendo negativamente a qualidade do alimento e saúde dos indivíduos, principalmente imunocomprometidos (ANDRADE; LANÇAS, 2015; MOAZAM; DENNING, 2017).

Micotoxinas são substâncias químicas de baixo peso molecular produzidas como metabólitos secundários por fungos filamentosos, podendo ser produzidas em qualquer idade, mas a maior produção ocorre principalmente quando os fungos atingem a maturidade e estão diretamente relacionadas com produtos alimentícios tanto de origem animal quanto vegetal (RUYCK et al., 2015; SADHASIVAM et al., 2017). De modo geral, as micotoxinas são formadas por grandes quantidades de precursores de metabólitos primários como aminoácidos, piruvato, acetato e outros. E a sua produção é uma estratégia do fungo para reduzir a quantidade de precursores que não são necessários para o seu metabolismo e também para sua defesa (FOOD INGREDIENTS BRAZIL, 2009).

Estudos revelam que a contaminação por micotoxinas na alimentação humana pode ocorrer de duas maneiras, direta ou indireta. A contaminação direta ocorre quando o alimento que está infectado por um fungo toxigênico é consumido por um indivíduo, como cereais, oleaginosas, frutos secos e café. A contaminação indireta ocorre quando os animais se alimentam com rações previamente contaminadas, podendo liberar micotoxinas na carne, ovos, leite e seus derivados (ROCHA et al., 2014).

A intoxicação causada por toxinas produzidas por fungos é conhecida como micotoxicose. Os seus sintomas dependem do tipo de micotoxina, da concentração e da duração da exposição, da idade, saúde e sexo do indivíduo exposto. As micotoxicoses podem ser classificadas como agudas ou crônicas. A micotoxicose aguda na maioria das vezes tem um início rápido e uma resposta tóxica evidente, ao passo que a toxicidade crônica é

caracterizada por exposição a baixas doses durante um longo período de tempo, resultando em cânceres e outros efeitos geralmente irreversíveis (RUYCK et al., 2015).

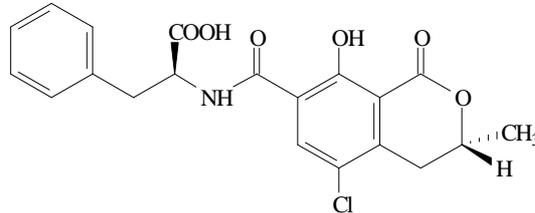
As toxinas com elevado grau de importância para indústrias em geral são produzidas por algumas espécies de *Aspergillus*, sendo a Ocratoxina A e Aflatoxina B1 e B2 (SADHASIVAM et al., 2017).

O gênero *Aspergillus* é considerado o maior causador de infecções fúngicas. Apesar do avanço no diagnóstico e tratamento da aspergilose, ainda é difícil prevenir e tratar doenças fúngicas, sendo a mortalidade ainda elevada, principalmente entre pacientes imunocomprometidos com infecções invasivas (CHOWDHARY et al., 2017). Várias espécies de *Aspergillus* causam infecções severas, como *Aspergillus fumigatus* (aproximadamente 90%), seguidas por *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* e *Aspergillus versicolor* (PAULUSSEN et al., 2017).

Dados atuais mostram que as infecções por *Aspergillus* não são desprezíveis e que a resistência antifúngica é um problema de saúde que cresce cada vez mais, principalmente entre pacientes imunocomprometidos. Isso destaca a necessidade de um diagnóstico confiável, sensível e rápido, para conter assim a morbimortalidade relacionada à aspergilose (ZAKARIA et al., 2020).

A Ocratoxina A é um grupo de derivados de isocumarina ligada a uma amina que, por sua vez, está unida a um grupo β -fenilalanina (Figura 8). É produzida principalmente por *A. ochraceus*, *A. carbonarius*, *A. alliaceus*, *A. auricomus* e raramente o *A. niger*. É uma micotoxina considerada nefrotóxica, hepatotóxica, teratogênica e imunossupressora (WANG et al., 2015). Essa toxina pode ser encontrada em diversos alimentos como feijão, trigo, aveia, cevada, milho, vinho, suco de uva, frutas secas, soja, cacau, chá, temperos, café torrado (moído ou grão) e produtos de origem animal como carnes, ovos e produtos lácteos (ANVISA, 2011).

Figura 8 - Estrutura química da Ocratoxina A.



A aflatoxina é considerada uma toxina de grande impacto no que diz respeito principalmente a produtos agrícolas, uma vez que, em condições favoráveis de umidade do produto, umidade relativa do ar e temperatura ambiente, podem se desenvolver incontrolavelmente. Essa toxina é produzida principalmente por fungos do gênero *Aspergillus*, especificamente *A. flavus* e *A. parasiticus*.

Várias aflatoxinas podem ser encontradas, e as principais são B1 (Figura 9) e B2 (Figura 10) que apresentam fluorescência azul-violeta e G1 e G2, que apresentam fluorescência azul-esverdeada, quando analisadas em cromatografia de camada delgada à luz ultravioleta a 365 nm (IAMANAKA, OLIVEIRA; TANIWAKI, 2010).

Figura 9 - Estrutura química da Aflatoxina B1.

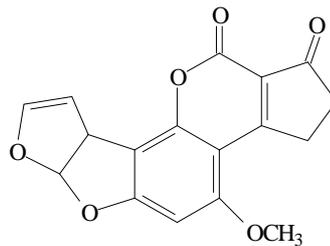
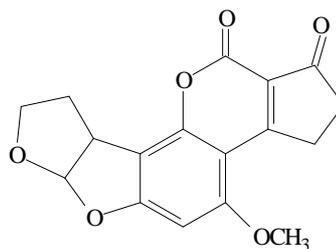


Figura 10 - Estrutura química da Aflatoxina B2.



As aflatoxinas podem ser encontradas em diferentes alimentos, como milho, amendoim, nozes, avelã, amêndoa, pimentas, noz-moscada, gengibre, figos, ração animal, algodão, leite em pó, queijos, etc. (ANVISA, 2011).

Assim como a ocratoxina A, as aflatoxinas são tóxicas, carcinogênicas e imunossupressoras, podendo induzir infecções em pessoas contaminadas. Indivíduos apresentando hepatite B (VHB) são mais sensíveis, pois quando expostos às aflatoxinas aumentam o risco de câncer no fígado, uma vez que o fígado é seu alvo principal. As doenças causadas pela exposição às aflatoxinas são chamadas de aflatoxicoses, e podem ser divididas em aguda e crônica. A aguda resulta em morte e a crônica em câncer, supressão imunológica e outras condições patológicas mais lentas. Dentre as aflatoxinas existentes, a B1 é a mais tóxica, pois pode causar efeitos diversos e, em alguns casos, podem ser letais para seres humanos e outros vertebrados (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009).

No ano de 1965, a Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (International Agency for Research on Câncer – IARC) foi fundada para conduzir e coordenar a investigação sobre as causas do câncer. Assim, foi criado um programa que analisa a evidência de câncer a partir de diversos agentes biológicos, químicos e físicos. Nesse contexto, algumas micotoxinas foram divididas em grupos de acordo com o processo de carcinogênese gerado (QUADRO 1).

Quadro 1 - Classificação das micotoxinas.

Classificação	Micotoxinas	
Carcinógenos do grupo 1	Aflatoxinas	Cancerígeno para o homem
Carcinógenos do grupo 2B	Fumonisina Ocratoxina A	Possivelmente carcinogênico para o homem
Carcinógenos do grupo 3	Tricoteceno Zearalenona Patulina	Não classificável quanto à sua carcinogenicidade em seres humanos

Fonte: IARC, 1993.

Sendo assim, vários países estabeleceram limites máximos de ocratoxina A e aflatoxina para diversos produtos. De acordo com a Resolução-RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011, os dados podem ser observados no quadro abaixo.

Quadro 2 - Limites de toxinas em produtos de acordo com a Resolução-RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011.

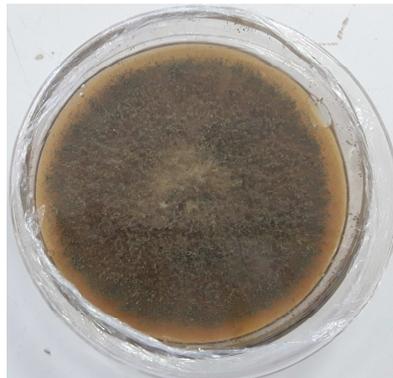
Alimentos	Limites Máximos Tolerados (µg/Kg)	
	Ocratoxina A	Aflatoxina
Cereais, produtos de cereais e cevada malteada	10	5
Feijão	10	5
Café torrado (moído ou grão) e café solúvel	10	-
Vinho e suco de uva	2	-
Produtos de cacau e chocolate	5	5
Frutas secas	10	10
Queijo	-	2,5
Pimentas, gengibre, noz-moscada (especiarias em geral)	30	20
Amendoim	-	20
Milho	-	20
Nozes, avelã e amêndoa	-	10

Fonte: Anvisa, 2011.

2.7.2 *Aspergillus flavus* (Aflatoxina)

Aspergillus flavus é uma espécie pertencente à seção Flavi, e seu desenvolvimento varia entre 7 a 42 °C, sendo sua temperatura ótima de crescimento de 25 °C. Esse microrganismo pode ser facilmente encontrado em vários alimentos, como nozes, amendoim, temperos, sementes oleaginosas, milho, sementes de algodão, cereais e, às vezes, em frutas secas (MOTTA et al., 2015). O aspecto geral de *A. flavus* pode ser visto na Figura 11.

Figura 11 - *Aspergillus flavus*.



Fonte: Do autor, 2019.

A espécie *A. flavus* é considerada a mais importante produtora de aflatoxinas, B1 e B2. Das 18 diferentes moléculas do grupo das aflatoxinas, a aflatoxina B1 é a substância carcinogênica mais conhecida e também uma das mais isoladas dos alimentos contaminados (ZERINGUE; BHATNAGAR; CLEVELAND, 1993). Linhagens de *A. flavus*, importantes produtoras de aflatoxinas, causam micotoxicoses em animais e aflatoxicose em humanos (MURRAY et al., 2006).

A aflatoxicose aguda se inicia após 6 horas da ingestão da micotoxina, apresentando severa depressão, presença de sangue nas fezes, tremores musculares, hipertermia e causando a morte. Entretanto, a aflatoxicose crônica desencadeia alterações patológicas mais prolongadas, como câncer e imunossupressão. Muitas vezes, a aflatoxicose se manifesta como hepatite, pois o principal órgão afetado pela aflatoxina B1 é o fígado (MURRAY et al., 2006). As aflatoxinas também atacam o DNA e o RNA, ligando-se ao DNA principalmente no nitrogênio 7 da guanina, dificultando assim a sua transcrição e diminuindo a síntese de RNA (LOPES et al., 2005).

A Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (International Agency for Research on Cancer – IARC) classifica as aflatoxinas como carcinógenos do grupo 1 – Confirmado Carcinógeno Humano (IARC, 1993).

2.7.3 *Aspergillus ochraceus* (Ocratoxina)

Aspergillus ochraceus é uma espécie que pertence à Seção Circumdati, podendo ser encontrada em diversos alimentos, como arroz, trigo, aveia, vinho, cereais e café. A temperatura ótima para o desenvolvimento da espécie *A. ochraceus* varia entre 24-31 °C, mas pode se desenvolver a partir de temperaturas mais baixas, entre 8 °C e 37 °C. A produção de toxina ocorre entre 12 °C e 37 °C, sendo a temperatura ótima de 25 °C e o pH ótimo de produção entre 5 e 6 (HASHIMOTO et al., 2012). Esse microrganismo é um dos maiores desafios na agricultura, pois é um expressivo produtor de ocratoxina A (FIGURA 12) (BATISTA et al., 2009), sendo uma das principais espécies consideradas ocratoxigênica dentro da seção.

Figura 12 - *Aspergillus ochraceus*.

Fonte: Do autor, 2019.

A ocratoxina se liga a proteínas plasmáticas, fazendo com que a micotoxina permaneça no sangue, tornando-se tóxica ao organismo. Essa ação tóxica acontece sobre o sistema renal. A nefrotoxicidade altera o tamanho dos rins, a osmolaridade e o volume da urina, e desencadeia o desenvolvimento de adenomas e tumores renais (NOGUEIRA; OLIVEIRA, 2006).

A Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (International Agency for Research on Cancer – IARC) classifica a ocratoxina A como carcinógenos do grupo 2B – Suspeito Carcinógeno Humano (IARC, 1993).

Estudos revelam a presença de *A. ochraceus* em pacientes imunocomprometidos e asmáticos, nem sempre como agente infeccioso (NEGRI et al., 2014). Pesquisas realizadas com 133 pacientes brasileiros com suspeita de aspergilose, provenientes de espécies de *Aspergillus*, mostraram que apenas 1 paciente apresentou infecção por *A. ochraceus* (NEGRI et al., 2014). Posteriormente, Carpagnano et al. (2014) demonstraram colonização com *A. ochraceus* em 3 de 43 pacientes com câncer de pulmão por amostragem empregando a escovação brônquica. No entanto, o fungo não foi encontrado em nenhum dos pacientes do grupo controle, sugerindo então uma infecção ativa não comprovada. Esse microrganismo foi relatado como o possível patógeno em um caso de aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA) relatada por Novey e Wells (1978).

Os antifúngicos sintéticos foram criados para tentar diminuir os danos que os microrganismos causam tanto na qualidade do alimento, quanto na saúde humana. Porém, tornou-se um inimigo para as indústrias em geral, uma vez que estudos revelam que esses produtos podem selecionar alguns microrganismos resistentes, além de causar alguns

problemas à saúde humana, se utilizados de maneira incorreta e/ou em concentrações elevadas (DJENANE et al., 2012).

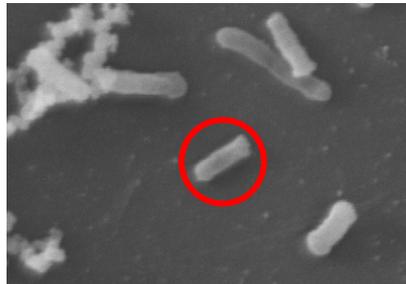
2.8 Bactérias

As bactérias são microrganismos patogênicos podendo ser benéficas ou causadoras de várias doenças infecciosas. O número de pessoas infectadas aumentou significativamente nos últimos anos; tal fato adverte a extensão do problema. Para o tratamento de infecções bacterianas, os antibióticos são essenciais; entretanto, o uso intenso e inadequado desses fármacos tem favorecido a criação de bactérias resistentes ao medicamento. Assim, as bactérias sensíveis são eliminadas; porém as bactérias resistentes têm a capacidade de proliferar tornando-se uma crise mundial (LIU et al., 2018).

Uma das causas da proliferação de bactérias resistentes é o uso de antibióticos na produção de alimentos para animais. Pesquisas de Liu et al. (2018) relatam que tal fato foi relacionado ao surgimento de patógenos oportunistas colonizadores, como *S. aureus*. No passado, os patógenos *S. aureus* e *E. coli* tornaram-se modelos de como o uso de antibióticos na produção de alimentos pode sustentar o surgimento de novas cepas de patógenos oportunistas colonizadores que podem se espalhar para os seres humanos.

2.8.1 *Escherichia coli*

E. coli pertence à família Enterobacteriaceae, sendo definida como bastonetes retos Gram-negativos (FIGURA 13), anaeróbios facultativos, catalase-positivos, oxidase-negativos e se locomovem por um flagelo peritríquio. *E. coli* faz parte de um importante grupo conhecido como bactérias entéricas. Bactérias que pertencem a esse grupo habitam o trato intestinal de seres humanos e outros animais, sendo *E. coli* um dos habitantes mais comum do trato intestinal de seres humanos. A maioria das bactérias entéricas são fermentadoras ativas de glicose e outros carboidratos. A temperatura ótima para seu crescimento varia entre 35 - 40 °C, mas podem desenvolver em uma temperatura mínima de 7 - 8 °C e uma máxima de 44 - 46 °C (BATISTA, 2014).

Figura 13 - *Escherichia coli*.

Fonte: Do autor, 2018.

E. coli naturalmente faz parte da flora normal do intestino humano e de outros animais (GOMES et al., 2016). Em geral, a *E. coli* é uma bactéria considerada inofensiva ao ser humano; entretanto, algumas linhagens podem se tornar patogênicas e infectar a área intestinal causando doenças graves, como gastroenterite, infecções urinárias, podendo afetar a corrente sanguínea e o sistema nervoso central (CLEMENTS et al., 2012; CROXEN; FINLAY, 2010).

Atualmente os principais tipos de *E. coli* patogênica são *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC), *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC) e *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC). Seus principais sintomas são caracterizados por náuseas, vômitos, diarreia, cólicas abdominais e febre. Esses sintomas podem durar de 6 horas a 9 dias, com período de incubação que varia de 8 a 72 horas (GÓMEZ-ALDAPA et al., 2016).

A *E. coli* é uma bactéria patogênica oportunista e tem causado milhões de infecções em todo o mundo, 1,7 bilhão de casos por ano (YANG et al., 2017). A EPEC é considerada um dos agentes causadores predominantes da diarreia humana (GAYTÁN et al., 2016). Causa diarreia prolongada moderada a grave, acompanhada de febre leve e, às vezes, vômito (KOTLOFF et al., 2013). Atualmente, a EPEC causa diarreia grave na população em países em desenvolvimento (HU; TORRES, 2015), como Brasil, Chile, Peru e México (LIU et al., 2018; OCHOA et al., 2008).

Esse patógeno extracelular é transmitido de hospedeiro para hospedeiro via fecal-oral (BALIÈRE et al., 2015), por meio da ingestão de alimentos e água contaminados e de superfícies contaminadas (YEN et al., 2016).

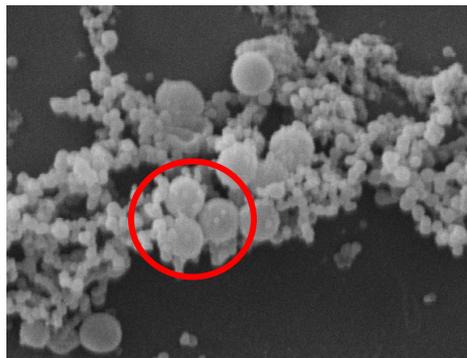
A EPEC foi detectada em ostras e mexilhões na Venezuela e berbigão na França (BALIÈRE et al., 2015; VILLALOBOS; ELQUEZABAL, 2000).

2.8.2 *Staphylococcus aureus*

Os *Staphylococcus* apresentam-se na forma de cocos Gram e catalase-positivos, com aproximadamente 0,5 a 1,5 μm de diâmetro, imóveis, não esporulados e geralmente não encapsulados. Esse microrganismo pode apresentar-se em diversas formas, como isolados, aos pares, em cadeias curtas, ou agrupados irregularmente (com aspecto semelhante a um cacho de uvas), devido à sua divisão celular (FIGURA 14) (SILVA et al., 2017a; CASSETTARI; STRABELLI; MEDEIROS, 2005)

O gênero *Staphylococcus* faz parte da microbiota de vários sítios anatômicos humanos. *S. aureus* pertencente à família Micrococcaceae, crescem sob condições aeróbias facultativos, e em meios comuns sob condições de pressão osmótica elevada e baixa umidade, em $\text{pH} = 7$ e a temperatura ótima de $37\text{ }^\circ\text{C}$, podendo se desenvolver também em uma temperatura mínima de $7\text{ }^\circ\text{C}$ e uma máxima de $45\text{ }^\circ\text{C}$. A toxina produzida por esse microrganismo denomina-se enterotoxina e a temperatura ótima para produção de toxina varia de $40\text{-}45\text{ }^\circ\text{C}$, mas podem ser produzidas em uma escala de $10\text{-}48\text{ }^\circ\text{C}$ (SILVA et al., 2017a). Isso explica porque crescem e sobrevivem em determinados locais e alimentos, como em secreções nasais e na pele, presunto e outros tipos de carnes ou até mesmo em alimentos com baixa umidade, pois nessas condições outros microrganismos são inibidos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

Figura 14 - *Staphylococcus aureus*.



Fonte: Do autor, 2018.

S. aureus é a espécie de maior interesse médico, pois é uma bactéria relacionada a diversas infecções em seres humanos (CASSETTARI; STRABELLI; MEDEIROS, 2005; KONEMAN et al., 2001). Essa espécie é capaz de resistir à dessecação e ao frio, podendo permanecer viável por longos períodos em partículas de poeira. Esse microrganismo pode

ser encontrado no ambiente humano, sendo o homem seu principal reservatório, em fossas nasais, garganta, intestinos e pele, sendo as narinas o sítio mais colonizado (CARVALHO et al., 2005; CAVALCANTI et al., 2005).

Devido à resistência a antibióticos e à capacidade de se desenvolverem rapidamente, o *S. aureus* se torna individualmente perigoso em áreas hospitalares, pois são produtores da toxina responsável pela síndrome do choque séptico, uma infecção grave caracterizada por hipertermia, vômito, podendo causar a morte. As intoxicações humanas podem ser causadas pela ingestão de enterotoxinas. Sua ingestão causa tanto infecções simples (espinhas, furúnculos, etc) como infecções graves (pneumonia, endocardite, sinusite, artrite e infecções no trato urinário) (SILVA et al., 2017a).

Agentes químicos são utilizados para controlar o crescimento de microrganismos. Todavia, poucos agentes químicos reduzem as populações microbianas em níveis seguros ou removem as formas vegetativas de patógenos em superfícies. Há vários anos, os óleos essenciais, metabólitos secundários de plantas, têm ganhado maior destaque por serem um produto natural, apresentando grande aceitação pelos consumidores, elevado potencial de uso multifuncional e causando menores riscos em comparação aos aditivos sintéticos (ANDRADE et al., 2012; MIRANDA et al., 2014).

2.9 Atividade antioxidante

A procura por produtos naturais com potenciais biológicos vem aumentando cada vez mais, pois substâncias naturais como óleo essencial de plantas podem ser utilizadas nos alimentos, a fim de conferir sabor, aroma e propriedades antioxidantes, antimicrobianas e nutricionais, além de causar menos impacto ao meio ambiente.

Quimicamente as substâncias antioxidantes compõem a formulação de diversos produtos como alimentos, cosméticos, fármacos, etc. Essas substâncias, mesmo em pequenas concentrações, conseguem impedir ou retardar a velocidade da oxidação daquele produto que a contém. Esse processo pode ser realizado por meio de um ou mais mecanismos, e essas substâncias também podem inibir ou diminuir os efeitos causados pelos radicais livres e compostos oxidativos presentes em substratos oxidáveis (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Os radicais livres e outros oxidantes são os grandes responsáveis pelas doenças autoimunes, doenças infecciosas e/ou inflamatórias, doenças degenerativas (como câncer,

doenças cardiovasculares, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais), além de ser o principal causador do envelhecimento. Os antioxidantes bloqueiam o efeito causado pelos radicais livres, uma vez que são formados durante as reações metabólicas ou por fatores exógenos ao organismo. A geração de radicais livres é normalmente equilibrada pela ação dos antioxidantes endógenos e exógenos (SHAHIDI; HO, 2007).

As substâncias antioxidantes podem ser endógenas e exógenas e podem ser enzimáticas e não enzimáticas. O mecanismo endógeno tem como exemplos as superóxidos dismutases, catalase, glutatona peroxidase e glutatona redutase. Esses controlam níveis de peróxido de hidrogênio; portanto, colaboram para a diminuição dos níveis de radicais livres. Além dessas enzimas, o mecanismo endógeno é composto de substâncias não enzimáticas, como α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno, ácido ascórbico (vitamina C). Os compostos fenólicos e demais metabólitos secundários vegetais, além de zinco, cobre, selênio e magnésio, são de extrema importância, pois fazem parte da estrutura das enzimas responsáveis pelo controle das espécies reativas (SHAHIDI; HO, 2007).

Os antioxidantes sintéticos, como os compostos fenólicos butil-hidroxi-anisol (BHA), 2,6-di-tert-butil-4-hidroxitolueno (BHT), tert-butil-hidroquinona (TBHQ) e galato de propila (PG) também são muito utilizados, no entanto, estudos toxicológicos têm demonstrado efeito carcinogênico dos antioxidantes sintéticos em experimentos com animais (ANDRADE et al., 2011).

Essas substâncias sintéticas, mesmo causando grande impacto, vêm sendo utilizadas cada vez mais, pois são uma das poucas alternativas disponíveis para indústrias de alimentos, uma vez que são utilizadas no intuito de prevenir a oxidação de alimentos e combater a formação de radicais livres. As alterações nos alimentos também podem estar relacionadas com a rancidez oxidativa, que é responsável principalmente por alterações indesejáveis de cor, sabor, aroma e consistência do alimento. Nesse caso, resultam da peroxidação lipídica, que é um processo em que os radicais livres ou espécies não radicalares atacam os lipídios, os óleos ou os ácidos graxos poliinsaturados presentes nos substratos, gerando novos tipos de radicais como produto da degradação desses compostos, interferindo nas características organolépticas dos alimentos, causando a perda do seu valor nutricional e comercial (AYALA et al., 2014).

Radicais livres são espécies instáveis e extremamente reativas; no entanto, a produção equilibrada de radicais livres é muito importante, pois estão envolvidos na produção de ATP,

fagocitose e regulação do crescimento celular. Logo, a produção desequilibrada de radicais livres no organismo causa dano oxidativo em células e tecidos, resultando na peroxidação lipídica das membranas, nas modificações das proteínas, dano à base do DNA e lesão de reperusão. A produção excessiva de radicais livres é denominada estresse oxidativo (ABRAHÃO et al., 2010; OLSZEWER, 2008; PEREIRA; CARDOSO, 2012).

2.10 Atividade repelente - *Rhipicephalus sanguineus sensu lato*

Acarinos pertencem a uma subclasse de artrópodes da classe dos Aracnídeos que inclui espécies como aranhas, ácaros, carrapatos, entre outros. Os carrapatos são hematófagos e fazem parte de três importantes famílias; Argasidae, Ixodidae e Nuttalliellidae. Os carrapatos pertencentes à família Ixodidae; também são conhecidos como carrapatos duros, uma vez que apresentam um escudo na parte dorsal de seus corpos. No caso dos machos, cobre totalmente o dorso, e das fêmeas, cobre parcialmente. Os carrapatos Ixodídeos apresentam peças bucais relativamente curtas e uma secreção de grandes quantidades de cemento responsáveis pela fixação em seu hospedeiro. Seu processo de alimentação é mais extenso, e por isso, conseguem ingerir grandes quantidades de sangue (SONENSHINE; ROE, 2014).

Carrapatos ixodídeos pertencem ao grupo mais importante de vetores de patógenos dentro do filo Arthropoda (MARCONDES, 2009). O ciclo de vida desses carrapatos pode ser dividido em três estágios (larva, ninfa e adultos), todos com um único instar. Os ixodídeos são responsáveis por manter e transmitir muitos patógenos, incluindo bactérias, protozoários e vírus. Esses patógenos são de grande impacto na veterinária e saúde pública, pois afetam animais domésticos e humanos (DANTAS-TORRES; CHOMEL; OTRANTO, 2012).

O gênero *Rhipicephalus* é facilmente encontrado, pois é amplamente distribuído em todo o continente e possui dois representantes com alta incidência no Brasil: *Rhipicephalus sanguineus* e *Rhipicephalus microplus* (ANDREOTTI et al., 2014).

O carrapato da espécie *R. sanguineus*, popularmente conhecido como carrapato-vermelho-do-cão, é um parasita de cães que pode parasitar outros hospedeiros em condições especiais, incluindo seres humanos. *Rhipicephalus sanguineus* é vetor de muitos agentes infecciosos, por exemplo, *Rickettsia rickettsii*, agente causador da Febre Maculosa das Montanhas Rochosas. Também é transmissor de *Rickettsia conorii*, agente causador da Febre

Maculosa do Mediterrâneo na Europa (DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2015). No Brasil, *R. sanguineus* é considerado vetor da bactéria *Rickettsia rickettsii*, agente causador da Febre Maculosa Brasileira (SILVA et al., 2017b).

Devido à grande preocupação com certas doenças causadas por parasitas, *R. sanguineus* é um dos carrapatos mais estudados. Vários estudos têm sido realizados pelo mundo, pois o conhecimento biológico e ecológico desse carrapato é essencial para uma melhor compreensão da ecoepidemiologia das doenças transmitidas por esses vetores. Do ponto de vista etológico, *R. sanguineus* é endofílico, monotrófico e precisa de três hospedeiros, um para cada estágio da vida. Apesar de ser altamente endofílico, *R. sanguineus* também é capaz de sobreviver em ambientes externos, por exemplo, paredes de calcário. Essa espécie, apesar de monotrófica, pode se alimentar de outros hospedeiros que não pertencem à sua "cadeia trófica natural". Isso demonstra que *R. sanguineus* é um carrapato que pode adotar diferentes estratégias de sobrevivência, conforme a necessidade. E mais, essa espécie aumenta sua preferência por humanos e coelhos com a elevação da temperatura (PAROLA et al., 2008; SOCOLOVSKI; RAOULT; PAROLA, et al., 2009). De acordo com Dantas-Torres (2010), se ocorrer um aumento de dois a três graus Celsius provocados pelo aquecimento global, essa estratégia de adaptação a elevadas temperaturas pode ser fator determinante para o aumento de casos de parasitoses transmitidas por esse carrapato a humanos.

Uma fêmea de *R. sanguineus* é capaz de fazer a postura de até quatro mil ovos, mas a quantidade de ovos depende do peso da fêmea e do tempo de postura. E o período de oviposição pode durar várias semanas (KOCH, 1982). Em condições controladas, as larvas podem eclodir em até 32 dias após a postura e vão se alimentar por quatro dias transformando-se em ninfas. Desse modo, a ninfa se alimenta de quatro a sete dias, passando assim para a fase adulta em aproximadamente 33 dias. Nesse estágio, a fêmea se alimenta por cerca de nove dias e, então, inicia-se o período pré-oviposição, que varia de três dias a algumas semanas. No entanto, na falta de um hospedeiro, na fase adulta, os carrapatos podem permanecer em jejum por períodos longos, aproximadamente 12 meses quando conservados em temperaturas de 20 °C (DANTAS-TORRES et al., 2010; TROUGHTON; LEVIN, 2007). Nesse sentido, fica evidente a necessidade de estudos aprofundados, com o intuito de validar métodos eficientes para o controle de carrapatos (SILVA et al., 2017b).

Esse controle pode ser alcançado com vacinas e acaricidas sintéticos ou naturais (óleos e extratos vegetais) entre outros (CONTRERAS et al., 2017; MILLER et al., 2011; TAK;

ISMAN, 2017). Os acaricidas sintéticos são os mais utilizados; entretanto, seu uso indiscriminado pode causar efeitos nocivos em animais, plantas e humanos, e também contaminar o solo e a água (TSABOULA et al., 2016). Os óleos essenciais provenientes de fontes naturais são uma alternativa promissora no controle de *R. sanguineus* devido à grande variedade de espécies de plantas existentes, uma vez que são de baixo custo e de ampla diversidade (BENELLI et al., 2016).

2.11 Inibição da enzima acetilcolinesterase

A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima neuronal essencial em sinapses colinérgicas e junções neuromusculares nos vertebrados e invertebrados. Sua principal função é a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh), ocorrendo assim a regulação da neurotransmissão (MUTERO; FOURNIER, 1992). A AChE é alvo de pesticidas organofosforados e carbamato no controle de pragas. Devido ao uso indiscriminado de pesticidas, tem ocorrido a seleção de muitos parasitos resistentes (LEE et al., 2015). Diante disso, torna-se necessária a busca por novas substâncias com potencial acaricida e inseticida, sendo os inibidores da AChE compostos de grande potencial biocida em insetos e carrapatos.

Em razão de resíduos de acaricidas, resistência a medicamentos, poluição ambiental e outros efeitos negativos à segurança pública induzidos pelo uso excessivo de alguns agentes, o uso de acaricidas comerciais tem sido dificultado (GOULD, 2010). Assim, torna-se significativo o desenvolvimento de acaricidas alternativos e ecologicamente corretos a partir de produtos naturais (SUN et al., 2017), e muitos agentes acaricidas baseados em plantas foram desenvolvidos e usados para tratar e controlar a proliferação de ácaros (QIN; ZHANG, 2013; ROSADO-AGUILAR et al., 2017).

Produtos vegetais, como óleos essenciais e seus constituintes majoritários, têm sido amplamente estudados quanto às propriedades de controle de pragas, incluindo efeitos tóxicos (DON-PEDRO, 1996) e repelentes (PASCUAL-VILLALOBOS; BALLESTA-ACOSTA, 2003), ovicidas e outras propriedades (ALVAREZ-CASTELLANOS et al., 2001). Óleos essenciais com atividade acaricida e inseticida atuam por diferentes mecanismos de ação, sendo a inibição da enzima AChE um importante alvo desses compostos, pois sua inibição ocasiona o acúmulo de acetilcolina e, conseqüentemente, a morte do parasito (RIBEIRO et al., 2012).

Muitos metabólitos secundários das plantas, como os monoterpenoides, têm atividade inseticida contra pragas de produtos armazenados (LEE et al., 2003; REGNAULT-ROGER; HAMRAOUI, 1995). Os monoterpenóides foram os primeiros inibidores naturais a serem considerados inibidores da AChE.

Benabdallah et al. (2018) e Houghton et al. (2006) observaram que o óleo essencial extraído de espécies de *Mentha* é um importante inibidor da acetilcolinesterase, sugerindo que tal propriedade pode ocorrer devido aos monoterpenos oxigenados, como mentofurano, rotundifolona, mentol e pulegona, que foram os principais componentes encontrados nos óleos essenciais de *Mentha*. Já Sousa Barros et al. (2015) não registraram nenhuma atividade inibitória para mentol e pulegona, quando avaliaram os óleos essenciais de *Mentha* de origem brasileira. Öztürk (2012) e Picollo et al. (2008) sugerem outros terpenos, como α -pineno, 1,8-cineol, cânfora e linalol, também com efeito inibidor da AChE.

Aazza et al. (2011) relatam o efeito inibidor da AChE dos óleos essenciais quando ricos em monoterpenos, podendo atuar como inibidores competitivos ou não competitivos devido à sua hidrofobicidade e capacidade de interagir com o local hidrofóbico desta enzima.

3 REFERÊNCIAS

- AAZZA, S.; LYOUSSI, B.; MIGUEL, M. G. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of some commercial essential oils and their major compound. **Molecules**, v. 16, p. 7672-7690, 2011.
- ABRAHÃO, S. A. et al. Compostos bioativos e atividade antioxidante do café. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, p. 414-420, 2010.
- ADUKWU, E. C. et al. Antimicrobial activity, cytotoxicity and chemical analysis of lemongrass essential oil (*Cymbopogon flexuosus*) and pure citral. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, p. 9619-9627, 2016.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGIÂNCIA SANITÁRIA. Resolução No. 7 de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Brasília: ANVISA, 2011.
- AGNOLIN, C. A.; OLIVO, C. J.; PARRA, C. L. C. Efeito do óleo de capim limão (*Cymbopogon flexuosus* Stapf) no controle do carrapato dos bovinos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.16, n.1, p.77-82, 2014.
- AJAYI, O. S. et al. Acetylcholinesterase inhibitor from *Anthocleista vogelii* leaf extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 231, p. 503-506, 2019.
- AKDOGAN, M. et al. Investigating the effectiveness of different tea types from various thyme kinds (*Origanum onites*, *Thymbra spicata* and *Satureja cuneifolia*) on anemia and anticholesterolemic activity. **Toxicol Ind Health.**, v. 30, p. 938-949, 2014.
- AKHBARI, M. et al. Analysis and evaluation of the antimicrobial and anticancer activities of the essential oil isolated from *Foeniculum vulgare* from Hamedan. **Nat Prod Res.**, p. 1-4, 2019.
- ALBUQUERQUE, E. X. et al. Effective countemeasure against by organophosphorus insecticides and nerve agents. **Proceedings of the National Academy of Sciences oh the USA**, v.103, n. 35, p. 13220-13225, 2006.
- ALVAREZ-CASTELLANOS, P.; BISHOP, C. D.; PASCUAL-VILLALOBOS, M. J. Antifungal activity of the essential oil of flowerheads of garland chrysanthemum (*Chrysanthemum coronarium*) against agricultural pathogens. **Phytochemistry**, v. 57, p. 99-102, 2001.
- ANDRADE, M. A. et al. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 2, p. 399-408, 2011.

ANDRADE, M. A. et al. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 43, n. 2, p. 399-408, 2012.

ANDRADE, M. A.; LANÇAS, F. M. Estado da arte na análise cromatográfica de Ocratoxina A em amostras de alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 7, n. 1, p. 31-52, 2015.

ANDREOTTI, R. *Tagetes minuta* Linnaeus (Asteraceae) as a Potential New Alternative for the Mitigation of Tick Infestation. **Medicinal & Aromatic Plants**, v. 03, n. 04, p. 3–7, 2014.

ASSAEI, R. et al. Hepatoprotective effect of *Satureja khuzestanica* essential oil and vitamin E in experimental hyperthyroid rats: evidence for role of antioxidant effect. **Iran J Med Sci.**, v. 39, p. 459-466, 2014.

AYALA, A.; MUÑOZ, M. F.; ARGÜELLES, S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2014, 2014.

AZEVEDO, I. L. et al. Eficácia *in vitro* do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon flexuosus* steud. wats.) frente a bactérias entéricas de origem avícola. **Acta Veterinária Brasileira**, v.10, n.1, p.25-31, 2016.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, Feb, 2008.

BALIÈRE, C. et al. Prevalence and characterization of Shiga toxinproducing and enteropathogenic *Escherichia coli* in shellfish-harvesting areas and their watersheds. **Front. Microbiol.**, v.6, p. 1-15, 2015.

BATISTA, L. R. et al. Ochratoxin A in coffee beans (*Coffea arabica* L.) processed by dry and wet methods. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 9, p. 784-790, 2009.

BATISTA, L. R. **Toxinfeccoes Alimentares**, 2014.

BENABDALLAH, A. et al. Chemical composition, antioxidant activity and acetylcholinesterase inhibitory of wild *Mentha* species from northeastern Algeria. **South African Journal of Botany**, v. 116, p.131-139, 2018.

BENELLI, G. et al. Tick repellents and acaricides of botanical origin: a green roadmap to control tick-borne diseases? **Parasitology Research**, v. 115, n. 7, p. 2545–2560, 2016.

BERG, J. M. T.; LUBERT, J. **Bioquímica**. 6.Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 545p., 2008.

BOUYAHYA, A. et al. Chemical variability of *Centaureum erythraea* essential oils at three developmental stages and investigation of their *in vitro* antioxidant, antidiabetic, dermatoprotective and antibacterial activities. **Industrial Crops & Products**, v. 132, p.111-117, 2019.

CARPAGNANO, G. E. et al. *Aspergillus* spp. Colonization in exhaled breath condensate of lung cancer patients from Puglia Region of Italy. **BMC Pulm. Med.**, v. 14, p. 22, 2014.

CARVALHO, C. et al. Monitoramento microbiológico seqüencial da secreção traqueal em pacientes intubados internados em unidade de terapia intensiva pediátrica. **J Pediatr**, v. 81, n. 1, p. 29-33, 2005.

CASSETTARI, V. C.; STRABELLI, T.; MEDEIROS, E. A. S. *Staphylococcus aureus* bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality ? **Braz J Infect Dis**, v. 9, n. 1, p. 70-6, 2005.

CAVALCANTI, S. et al. Prevalence of *Staphylococcus aureus* introduced into intensive care units of a university hospital. **Braz J Infect Dis**, v. 9, n. 1, p. 56-63, 2005.

CAVALIERI, E. et al. Alpha-Bisabolol, a nontoxic natural compound, strongly induces apoptosis in glioma cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 315, p. 589-594, 2004.

CETIN, H. et al. Acaricidal activity of *Satureja thymbra* L. essential oil and its major components, carvacrol and gamma-terpinene against adult *Hyalomma marginatum* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 170, p. 287-290, 2010.

CHANTRAINE, J. M. et al. Insecticidal activity of essential oils on *Aedes aegypti* larvae. **Phyther. Res.** 12, 350–354, 1998.

CHAO, S. C.; YOUNG, D. G.; OBERG, C. J. Screening for Inhibitory Activity of Essential Oils on Selected Bacteria, Fungi and Viruses. **J. Essent. Oil Res.**, v. 12, p. 639-649, 2000.

CHORIANOPOULOS, N. et al. Essential oils of *Satureja*, *Origanum*, and *Thymus* species: chemical composition and antibacterial activities against foodborne pathogens. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 8261-8267, 2004.

CHOWDHARY, A.; SHARMA, C.; MEIS, J. F. Azole-resistant aspergillosis: epidemiology, molecular mechanisms, and treatment. **J Infect Dis**, v. 216, p. 436-44, 2017.

CLEMENTS, A. et al. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Gut Microbes**, v. 3, p. 71-87. 2012.

CONTRERAS, M. et al. Vaccinomics Approach to the Identification of Candidate Protective Antigens for the Control of Tick Vector Infestations and *Anaplasma phagocytophilum* Infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. August, p. 1-15, 2017.

COPETTI, M. V. Micobiota do cacau: fungos e micotoxinas do cacau ao chocolate. **Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos**, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 155p., 2009.

COSTA, K. A. et al. Determinação da atividade antibacteriana e antioxidante do óleo essencial das folhas de *Cymbopogon flexuosus* contra *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas aeruginosa*. **Revista CSBEA**, v. 3, n. 1, 2017.

CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 26-38, 2010.

CRUZ T, CABO M, JIMENEZ J, ZARZUELO A. Composition and pharmacological activity of the essential oil of *Satureja obovata* ii. spasmolytic activity. **Fitoterapia**. 1990;61:247e251.

DALZIEL, J. M. **The Useful Plant of West Tropical Africa**. Crown Overseas Agents for the Colonies, London, 1937, p. 461.

DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Further thoughts on the taxonomy and vector role of *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. **Veterinary Parasitology**, v. 208, n. 1-2, p. 9-13, 2015.

DANTAS-TORRES, F.; CHOMEL, B. B.; OTRANTO, D. Ticks and tick-borne diseases: A One Health perspective. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 10, p. 437-446, 2012.

DANTAS-TORRES, F. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasites & Vectors**, v. 3, n. 1, p. 26, 2010.

DELORY, B. M. et al Root-emitted volatile organic compounds: can they mediate belowground plant-plant interactions? **Plant and Soil**, v. 402, n. 1, p.1-26, 2016.

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

DJENANE, D. et al. Antioxidant and antibacterial effects of *Lavandula* and *Mentha* essential oils in minced beef inoculated with *E. coli* O157:H7 and *S. aureus* during storage at abuse refrigeration temperature. **Meat Science**, v. 92, n. 4, p. 667-674, 2012.

DESAI, M. A.; PARIKH, J. Hydrotropic Extraction of Citral from *Cymbopogon flexuosus* (Steud.) Wats. **Industrial & Engineering Chemical Research**. v. 51, n. 9, p. 3750-3757, 2012.

DON-PEDRO, K. N. Fumigant toxicity is the major route of insecticidal activity of citruspeel essential oils. **Pestic. Sci.**, v. 46, p.71-78. 1996.

DUKE, J. A.; BECKSTORM-STERBERG. **Handbook of Medicinal Mints (Aromathematics) Phytochemicals and Biological Activities**. CRC Press, USA, p. 273-29-, 2001.

EL ASBAHANI, A.; MILADI, K.; BADRI, W. et al. Essential oils: from ex- traction to encapsulation. **Int J Pharm**. v. 483, p. 220-243, 2015.

ELGNDI, M. A. et al. Antioxidative and cytotoxic activity of essential oils and extracts of *Satureja montana* L., *Coriandrum sativum* L. and *Ocimum basilicum* L. obtained by supercritical fluid extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 128, p. 128-137, 2017.

- ESMAEILI-MAHANI, S. et al. *Satureja khuzestanica* prevents the development of morphine analgesic tolerance through suppression of spinal glial cell activation in rats. **J Nat Med.**, v. 69, p. 165-170, 2015.
- FALSAFI, T. et al. Chemical composition and anti-*Helicobacter pylori* effect of *Satureja bachtiarica* Bunge essential oil. **Phytomedicine.**, v. 22, p. 173-177, 2015.
- FOOD INGREDIENTS BRASIL. **As micotoxinas.** Revista Oficial da Food Ingredients South America, n 7, p. 32-40, 2009.
- GAONKAR, R. et al. Essential oil from *Cymbopogon flexuosus* as the potential inhibitor for HSP90. **Toxicology Reports**, v. 5, p. 489-496, 2018.
- GANJEWALA, D. *Cymbopogon* essential oils: Chemical compositions and bioactivities. **International Journal of Essential Oil Therapeutics**, v. 3, p. 56-65, 2009.
- GAYTÁN, M. O. et al. Type three secretion system in attaching and effacing pathogens. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 6, p. 1-25, 2016.
- GRANGER, R. E.; CAMPBELL, E. L.; JOHNSTON, G. A. (+) and (-)-borneol: efficacious positive modulators of GABA action at human recombinant alpha 1 beta 2 gamma 2L GABA9A) receptors. **Biochem. Pharmacol.**, v. 69, p. 1101-1111, 2005.
- GOHARI, A. R. et al. Evaluation of the cytotoxicity of *Satureja spicigera* and it's main compounds. **Sci World J**, 2012.
- GOULD, D., 2010. Prevention, control and treatment of Scabies. **Nurs. Stand.**, v. 25, p. 42-46.
- GOMES, T. A. et al. Diarrheogenic *Escherichia coli*. **Braz. J. Microbiol.**, v. 47 (Suppl. 1), p. 3-30, 2016.
- GÓMEZ-ALDAPA, C. A. et al. Prevalence and behavior of multidrug-resistant Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, enteropathogenic *E. coli* and enterotoxigenic *E. coli* on coriander. **Food Microbiology**, v. 59, p. 97-103, 2016.
- GUGLIELMONE, A. A.; ROBBINS, R. G.; APANASKEVICH, D. A.; PETNEY, T. N.; ESTRADA-PEÑA, A.; HORAK, I. G. Hard ticks (Acari: Ixodida: Ixodidae) of the world. **Springer Heidelberg**, 2014.
- GÜNDEL, S. S. et al. Nanoemulsions containing *Cymbopogon flexuosus* essential oil: Development, characterization, stability study and evaluation of antimicrobial and antibiofilm activities. **Microbial Pathogenesis**, v. 118, p. 268-276, 2018.
- GUPTA, A. D. et al. Chemistry, antioxidant and antimicrobial potential of nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt). **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 11, p. 25-31, 2013.

HAJHASHEMI, V. et al. Antispasmodic and anti-diarrhoeal effect of *Satureja hortensis* L. essential oil. **J Ethnopharmacol.**, v. 71, p. 187-192, 2000.

HALOC, E. I. et al. Evaluation of antifungal activity of *Satureja montana* essential oil before and after inclusion in beta-cyclodextrin. **Int J Pharm Pharm Sci**, v. 6, n. 7, p. 189-91, 2016.

HAMANN, M. et al. Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) inhibitory activity and structure-activity relationship (SAR) studies of the manzamine alkaloids. Potential for alzheimer's disease. **J. Nat. Prod.**, v. 70, n. 9, p. 1397-1405, 2007.

HASHIMOTO, K. et al. Mycotoxin production of some *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus fumigatus* isolated from the air. **Micotoxins**, v. 62, n. 1, p. 1-6, 2012.

HASSANEIN, H. D.; AHL HAH, S. A.; ABDELMOHSEN, M. M. Antioxidant polyphenolic constituents of *Satureja montana* L. growing in Egypt. **Int J Pharmacy Pharm Sci.**, v. 6, p. 578-581, 2014.

HOUGHTON, P. J.; REN, Y.; HOWES, M. J. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. **Nat. Prod. Rep.**, v. 23, p. 186-199, 2006.

HU, J.; TORRES, A. G. Enteropathogenic *Escherichia coli*: foe or innocent bystander? **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 21, p. 729-734, 2015.

IAMANAKA, B. T.; OLIVEIRA, I. S.; TANIWAKI, M. H. Micotoxinas em alimentos. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, Recife, v. 7, p. 138-161, 2010.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC), World Health Organization (WHO). Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. In **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**; IARC, v. 56, 1993.

JAFARI, F.; GHAVIDEL, F.; ZARSHENAS, M. M. A critical overview on the pharmacological and clinical aspects of popular *Satureja* species. **J. Acupunct. Meridian Stud.**, v. 9, p. 118-127, 2016.

JIA, M. et al. Chemical composition and acaricidal activity of *Arisaema anurans* essential oil and its major constituents against *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 261, p. 59-66, 2018.

JIANG, J. et al. Protective effects of lemongrass essential oil against benzo(a)pyrene induced oxidative stress and DNA damage in human embryonic lung fibroblast cells. **Toxicol. Mech. Methods**, p. 1-15, 2016.

JIN, H. et al. Myrislignan attenuates lipopolysaccharide-induced inflammation reaction in murine macrophage cells through inhibition of NF-kappa B signalling pathway activation. **Phytotherapy Research**, v. 26, p. 1320-1326, 2012.

- KARADAS, F. et al. Dietary essential oils improve the hepatic antioxidative status of broiler chickens. **British Poultry Science**, v. 55, n. 3, p. 329-334, 2014.
- KIRTIKAR, K. P. et al. **Indian Medicinal Plants**, vol. 4, International Book Distributors, Dehradun, 1986, pp. 2675-2683.
- KOCH, H. G. Oviposition of the Brown Dog Tick (Acari: Ixodidae) in the Laboratory. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 75, n. 5, p. 583-586, 1982.
- KONEMAN, E. et al. **Diagnóstico microbiológico**. 5 ed., 2001. cap. 11, parte 1.
- KOTLOFF, K. L. et al. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. **Lancet**, v. 382, p. 209-222, 2013.
- LABIOD, R.; AOUADI, S.; BOUHADDOUDA, N. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Satureja calamintha* nepeta against phytopathogens fungi. **Int J Pharmacy Pharm Sci.**, v. 7, p. 208-211, 2015.
- LEE, S. H. et al. Mutation and duplication of arthropod acetylcholinesterase: implications for pesticide resistance and tolerance. **Pestic. Biochem. Physiol.** 120, 118-124, 2015.
- LEE, S.; PETERSON, C. J.; COATS, J. R. Fumigation toxicity of monoterpenoids to several stored product insects. **Journal of Stored Products Research**, v. 39, n. 1, p. 77-85, 2003.
- LEITE, C. C. Perfil de solutos e micotoxinas na água do cultivo e beneficiamento do arroz. **Dissertação de Mestrado em Química Tecnológica e Ambiental**, Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS. 87p., 2010.
- LEREBOUR, G.; LARTAUD, P.; LACTROIX, B. Cosmetic Use of a Geraniol-rich Essential Oil of *Satureja montana* As Deodorant Active Agent., 2016.
- LIMA, R. K. et al. Bactericidal and Antioxidant Activity of Essential Oils from *Myristica fragrans* Houtt and *Salvia microphylla*. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.89, n.3, p.523-528, 2012.
- LIU, C. M. et al. *Escherichia coli* ST131-H22 as a Foodborne Uropathogen. **American Society for Microbiology**, vol. 9, 2018.
- LÜCKER, J. **Metabolic engineering of monoterpene biosynthesis in plants**. Wageningen: Proefschrift Wageningen University, 2002. 158 p.
- LUÍS, A. et al. Star anise (*Illicium verum* Hook. f.) essential oil: Antioxidant properties and antibacterial activity against *Acinetobacter baumannii*. **Flavour Fragr J.**, v. 34, p. 260-270, 2019.
- LOPES, H. V. CA-MRSA: um novo problema para o infectologista. **Rev Panam Infectol**, v. 7, n. 3, p. 34-6, 2005.

- LOPEZ, V. et al. Antihelmintic effects of nutmeg (*Myristica fragans*) on *Anisakis simplex* L3 larvae obtained from *Micromesistius potassou*. **Research in Veterinary Science**, v. 100, p. 148-152, 2015.
- LOPEZ-COBO, A. et al. Determination of phenolic compounds and antioxidant activity of a Mediterranean plant: The case of *Satureja montana* subsp. *kitaibelii*. **J Funct Food.**, v. 18(B), p.1167-1178, 2015.
- MARCONDES, C. B. **Doenças transmitidas e causadas por artrópodes**. São Paulo: Editora Atheneu 2009.
- MARZZOCO, A. E TORRES, B. B. **Bioquímica Básica**. 3. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 736 p., 2007.
- MILLER, N. J. et al. Tick Bite Protection With Permethrin-Treated Summer-Weight Clothing. **Journal of Medical Entomology**, v. 48, n. 2, p. 327-333, 2011.
- MIRANDA, C. A. S. F. et al. Correlação entre composição química e eficácia antioxidante de óleos essenciais de plantas condimentares por Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA). **E-xacta**, v.7, n.1, p.65-74, 2014.
- MITOSHI, M. et al. Suppression of allergic and inflammatory responses by essential oils derived from herbal plants and citrus fruits. **Int. J. Mol. Med.**, v. 33, p. 1643-1651, 2014.
- MOAZAM, S.; DENNING, D. W. *Aspergillus* nodules in chronic granulomatous disease attributable to *Aspergillus ochraceus*, **Medical Mycology Case Reports**, v. 17, p. 31-33, 2017.
- MOTTA, T. P. et al. Estudo sobre a ocorrência de fungos e aflatoxina B1 na dieta de bovinos leiteiros em São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 1, p. 23-28, 2015.
- MURRAY, A. P. et al. Natural AChE inhibitors from plants and their contribution to alzheimer's disease therapy. **Current Neuropharmacol.**, v. 11, n. 4, p. 388-413, 2013.
- MURRAY, P. R. et al. **Microbiologia Médica**. 5 .ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2006.
- MUTERO, A., FOURNIER, D. Post-translational modifications of *Drosophila* acetylcholinesterase. In vitro mutagenesis and expression in *Xenopus* oocytes. **J. Biol. Chem.** v. 267, p. 1695-1700, 1992.
- NAJAFI, G. et al. Protection against cyclosporine-induced reprotoxicity by *Satureja khuzestanica* essential oil in male rats. **Int J Fertil Steril.**, v. 9, p. 548-557, 2016.
- NARASIMHAN, A. S. DHAKE, J. **Med. Food**, v. 9, p. 395-399, 2006.
- NASCIMENTO, N. R. F. et al. Terpinen-4-ol: mechanisms of relaxation on rabbit duodenum. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 57, p. 467-474, 2005.

- NEGRI, C. E. et al. Cryptic and rare *Aspergillus* species in Brazil: prevalence in clinical samples and in vitro susceptibility to triazoles. **J. Clin. Microbiol.**, v. 52, n. 10, p. 3633-3640, 2014.
- NOGUEIRA, S.; OLIVEIRA, M. B. B. P. Prevalência de ocratoxina A em alimentos e consequentes problemas de segurança alimentar. **Revista da Sociedade Portuguesa de Ciências da Nutrição e Alimentação**, v. 12, n. 2, p. 69-75, 2006.
- NOVINSKY, C. O. Composição de micotoxinas e bromatologia de silagens de milho em silos de grande porte utilizando imagens de infravermelho. **Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias, Faculdade de Ciências Agrárias**, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. 85p., 2013.
- NOVEY, H. S.; WELLS, I. D. Allergic bronchopulmonary aspergillosis caused by *Aspergillus ochraceus*. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 70, n. 5, p. 840-843, 1978.
- OCHOA, T. J. et al. New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 102, p. 852-856, 2008.
- OISHI, K., MORI, K., NISHIURA, Y., Food hygienic studies on *Anisakinae* larvae-V effects of some spice essential oils and food preservatives on the mortality for *Anisakinae* larvae. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, v.40, p. 1241-1250, 1974.
- OLAJIDE, O. A.; AJAYI, F. F.; EKHELAR, A. L.; AWE, S. O.; MAKINDE, J. M.; ALADA, A. R. A. **Phytother. Res.**, v. 13, p. 344-345, 1999.
- OLIVEIRA, T. 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. 546-55, 2011.
- OLIVEIRA, J. N.; OLIVEIRA, A. V.; MENEGHELLO, E. R. **Análise Molecular de espécies de *Aspergillus* contaminantes de uvas vendidas no comércio de Maringá PR.** Iniciação Científica CESUMAR., v. 15, n. 2, p. 157-163, 2013.
- OLSZEWER, E. **Clínica Ortomolecular**. 2. Ed. São Paulo: Rocca, 544 p., 2008.
- OOTANI, M. A. et al. Use of essential oils in agriculture. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Gurupi, TO, v. 4, n. 2, p. 162-175, 2013.
- OTONI, C. G. et al. Trends in antimicrobial food packaging systems: Emitting sachets and absorbent pads. **Food Research International**, v. 83, n. 6, p. 60-73, 2016.
- ÖZTÜRK, M. Anticholinesterase and antioxidant activities of Savoury (*Satureja thymbra* L.) with identified major terpenes of the essential oil. **Food Chemistry**, v. 134, p. 48-5, 2012.
- PAROLA, P. et al. Warmer weather linked to tick attack and emergence of severe Rickettsioses. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 11, p. 1-8, 2008.

PASCUAL-VILLALOBOS, M. J.; BALLESTA-ACOSTA, M. C. Chemical variation in an *Ocimum basilicum* germplasm collection and activity of the essential oils on *Callosobruchus maculatus*. **Biochem. Systemat. Ecol.**, v. 31, p. 673-679, 2003.

PATOCKA, J. et al. Oxime reactivation of acetylcholinesterase inhibited by toxic phosphorus esters: in vitro kinetics and thermodynamics. *Journal of Applied Biomedicine*, v. 3, p. 91-99, 2005.

PAULUSSEN, C. et al. Ecology of aspergillosis: insights into the pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus* species. **Microb Biotechnol**, v. 10, p. 296-322, 2017.

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

PILLAI, S. et al. Anti-parasitic activity of *Myristica fragrans* Houtt. essential oil against toxoplasma gondii parasite. **3rd International Conference on Biotechnology and Food Science** (Icbfs 2012), v. 2, p. 92-96, 2012.

PHUONG THIEN, T. et al. Cytotoxic and anti-tumor activities of lignans from the seeds of Vietnamese nutmeg *Myristica fragrans*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 37, p. 399-403, 2014.

PICARD, I. et al. Repellency of essential oils to *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) as affected by type of oil and polymer release. **J. Econ. Entomol.**, v. 105, p. 1238-1247, 2012.

PICOLLO, M. I. et al. Anticholinesterase and pediculicidal activities of monoterpenoids. **Fitoterapia**, v. 79, p. 271-278, 2008.

QIN, X. C. et al. A tick-borne segmented RNA virus contains genome segments derived from unsegmented viral ancestors. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 111, p. 6744-6749, 2014.

REGNAULT-ROGER, C.; HAMRAOUI, A. Fumigant toxic activity and reproductive inhibition induced by monoterpenes on *Acanthoscelides obtectus* (Say) (coleoptera), a bruchid of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Author links open overlay panel. **Journal of Stored Products Research**, v. 31, n. 4, 1995, p. 291-299, 1995.

REZENDE, D. A. C. S. et al. Essential Oils from *Mentha piperita*, *Cymbopogon citratus*, *Rosmarinus officinalis*, *Peumus boldus* and *Foeniculum vulgare*: Inhibition of Phospholipase A₂ and Cytotoxicity to Human Erythrocytes. **American Journal of Plant Sciences**, v. 8, p. 2196-2207, 2017a.

REZENDE, D. A. C. S. et al. Characterization of the Biological Potential of the Essential Oils from Five Species of Medicinal Plants. **American Journal of Plant Sciences**, v. 08, p. 154 - 170, 2017b.

- RIBEIRO, V. L. S. et al. Effect of *Calea serrata* Less. n-hexane extract on acetylcholinesterase of larvae ticks and brain Wistar rats. **Veterinary Parasitology**, v. 189, p. 322-326, 2012.
- ROCHA, M. E. B. et al. Mycotoxins and their effects on human and animal health. **Food Control**, v. 36, n.1, p. 159-165, 2014.
- RODIANAWATI, I.; HASTUTI, P.; CAHYANTO, M. N. Nutmeg's (*Myristica fragrans* Houtt) Oleoresin: Effect of Heating to Chemical Compositions and Antifungal Properties. **Procedia Food Science**, v. 3, p. 244-254, 2015.
- ROSADO-AGUILAR, J. A. et al. Plant products and secondary metabolites with acaricide activity against Ticks. **Vet. Parasitol.**, v. 238, p. 66-76, 2017.
- RUYCK, K. et al. Dietary mycotoxins, co-exposure, and carcinogenesis in humans: Short review. **Mutation Research**, v. 766, p. 32-41, 2015.
- SADEGHI, I. et al. In vitro cytotoxic and antimicrobial activity of essential oil from *Satureja intermedia*. **Iran Red Crescent Med J.**, v. 15, p. 70-74, 2013.
- SADHASIVAM, S. et al. Rapid Detection and Identification of Mycotoxigenic Fungi and Mycotoxins in Stored Wheat Grain. **Toxins**, v. 9, p. 302, 2017.
- SARKHOSH, A. et al. Antifungal activity of five plant-extracted essential oils against anthracnose in papaya fruit. **Biol. Agric. Hortic.**, v. 34, p. 18-26, 2018.
- SHAHIDI, F.; HO, C. Antioxidant Measurement and Applications: An Overview. **Antioxidant Measurement and Applications**. American Chemical Society, 956 p., 2007.
- SHARMA, P. R. et al. Anticancer activity of an essential oil from *Cymbopogon flexuosus*, **Chemico Biological Interaction**, v. 179, p. 160-168, 2009.
- SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 5. ed. Editora Blucher, 535 p., 2017a.
- SILVA, A. B. et al. *Rickettsia rickettsii* infecting *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Latreille 1806), in high altitude atlantic forest fragments, Ceara State, Brazil. **Acta Tropica**, v. 173, n. May, p. 30-33, 2017b.
- SILVA, L. F. et al. Óleo essencial de *Satureja montana* L.: análise cromatográfica, determinação das atividades antioxidante e antifúngica. **E-xacta**, v. 8, n. 2, p. 55-63, 2015.
- SILVA, F. V. et al. Phytochemical profile and anticholinesterase and antimicrobial activities of supercritical versus conventional extracts of *Satureja montana*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 57, p. 11557-63, 2009.
- SIMÕES, C. M. D. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFSC/UFRGS, 2007. 1104 p.

- SKOČIBUŠIĆ, M.; BEŽIĆ, N. Chemical composition and antimicrobial variability of *Satureja montana* L. Essential oils produced during ontogenesis. **J Essent Oil Res**, v. 16, p. 387-391, 2004.
- SOCOLOVSCHI, C.; RAOULT, D.; PAROLA, P. Influence of temperature on the attachment of *Rhipicephalus sanguineus* ticks on rabbits. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, n. SUPPL. 2, p. 326-327, 2009.
- ŠOJIĆ, B.; et al. Essential oil versus supercritical fluid extracts of winter savory (*Satureja montana* L.) – Assessment of the oxidative, microbiological and sensory quality of fresh pork sausages. **Food Chemistry**, v. 287, p. 280-286, 2019.
- SONENSHINE, D. E.; ROE, R. M. **Biology of ticks**. New York: Oxford University Press, 2014.
- SONI, R.; SHARMA, G.; JASUJA, N. D. Essential Oil Yield Pattern and Antibacterial and Insecticidal Activities of *Trachyspermum ammi* and *Myristica fragrans*. **Hindawi Publishing Corporation Scientifica**, 2016.
- SOUSA BARROS, A. et al. Chemical composition and functional properties of essential oils from *Mentha* species. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 557-564, 2015.
- STANIC, G.; SAMARZIJA, I. Diuretic activity of *Satureja Montana* Subsp. *montana* extracts and oil in rats. **Phytotherapy Res.**, v. 7, p. 363-366, 1993.
- SUN, G. S. et al. Ovicidal and insecticidal activities of pyriproxyfen derivatives with an oxime ester group. **Molecules**, v. 22, n. 6, p. 958, 2017.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.
- TAK, J. H.; ISMAN, M. B. Acaricidal and repellent activity of plant essential oil-derived terpenes and the effect of binary mixtures against *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). **Industrial Crops and Products**, v. 108, n. August, p. 78-792, 2017.
- TAYLOR, T. A.; UNAKAL, C. G. *Staphylococcus Aureus*. NCBI Bookshelf. A service of the National Library of Medicine, National Institutes of Health, 2017.
- TEIXEIRA, M. L. et al. Essential Oil from *Lippia organoides* (Verbenaceae): Haemostasis and Enzymes Activity Alterations. **Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 1-8, 2018.
- TEPE, B.; CILKIZ, M. A pharmacological and phytochemical overview on *Satureja*. **Pharm. Biol.**, v. 54, p. 375-412, 2016.
- TORO-ARREOLA, S. D. et al. Effect of D-limonene on immune response in BALB/c mice with lymphoma. **Int. Immunopharmacol.**, v. 5, p. 829-838, 2005.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12 ed., Editora: Artmed, 964 p., 2017.

- TOZLU, E. et al. Chemical compositions and insecticidal effects of essential oils isolated from *Achillea gypsicola*, *Satureja hortensis*, *Origanum acutidens* and *Hypericum scabrum* against broadbean weevil (*Bruchus dentipes*). **Sci. Hortic.**, v. 130, p. 9-17, 2011.
- TROUGHTON, D. R.; LEVIN, M. L. Life Cycles of Seven Ixodid Tick Species (Acari: Ixodidae) Under Standardized Laboratory Conditions. **Journal of Medical Entomology**, v. 44, n. 5, p. 732–740, 2007.
- TSABOULA, A. et al. Environmental and human risk hierarchy of pesticides: A prioritization method, based on monitoring, hazard assessment and environmental fate. **Environment International**, v. 91, p. 78-93, 2016.
- VILLALOBOS, L.B., ELQUEZABAL, L. Detección de posible *Escherichia coli* enteropatógena en el bivalvo *Pinctada imbricata* comercializado en Cumaná. **Bol. Inst. Oceanogr.** 39, 17-23, 2000.
- 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.
- VITURRO, C. I. et al. Essential oils of *Satureja boliviana* and *s. parvifolia* growing in the region of Jujuy, Argentina. **Flavour Fragrance J.**, v. 15, p. 377-382, 2000.
- WANG, L. et al. Functional Characterization of New Polyketide Synthase Genes Involved in Ochratoxin A Biosynthesis in *Aspergillus Ochraceus* fc-1. **Toxins**, v. 7, p. 2723-2738, 2015.
- YAMASAKI, K. et al. Anti-HIV-1 activity of herbs in Labiatae. **Biol Pharm Bull.**, v. 21, p. 829-833, 1998.
- YANG, S. et al. Current pathogenic *Escherichia coli* foodborne outbreak cases and therapy development. **Arch. Microbiol.**, v. 199, p. 811-825, 2017.
- YAZDANPARAST, R.; SHAHRIYARY, L. Comparative effects of *Artemisia dracuncululus*, *Satureja hortensis* and *Origanum majorana* on inhibition of blood platelet adhesion, aggregation and secretion. **Vasc Pharmacol.**, v. 48, p. 32-37, 2008.
- YEN, H., KARINO, M., TOBE, T. Modulation of the inflammasome signaling pathway by enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, v. 6, p. 1-8, 2016.
- ZAKARIA, A. et al. Recent trends in the epidemiology, diagnosis, treatment, and mechanisms of resistance in clinical *Aspergillus* species: A general review with a special focus on the Middle Eastern and North African region. **Journal of Infection and Public Health**, v. 13, p. 1-10, 2020.
- ZANGARA, A. The psychopharmacology of huperzine A: an alkaloid with cognitive enhancing and neuroprotective properties of interest in the treatment of Alzheimer's disease. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 75, p. 675-686, 2003.

ZEIDAN-CHULIA, F. et al. Antibacterial and antigelatinolytic effects of *Satureja hortensis* L. essential oil on epithelial cells exposed to *Fusobacterium nucleatum*. **J Med Food.**, v. 18, p. 503-506, 2015.

ZERINGUE, J. R.; BHATNAGAR, D.; CLEVELAND, T. E. C₁₅H₂₄ volatile compounds unique to aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 59, p. 2264-2270, 1993.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

**ARTIGO 1 - POTENCIAL DE INIBIÇÃO DA ENZIMA
ACETILCOLINESTERASE E DO EFEITO REPELENTE SOBRE
Rhipicephalus sanguineus sensu lato DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Satureja
montana* L., *Myristica fragrans* H. E *Cymbopogon flexuosus***

RESUMO

Atualmente a utilização de óleos essenciais com potencial biológico vem ganhando espaço, sendo utilizados cada vez mais por diversos segmentos industriais. Na intenção de encontrar novos óleos essenciais com diferentes potenciais bioativos, objetivou-se neste trabalho extrair e caracterizar os óleos essenciais de *Satureja montana* L., *Myristica fragrans* H. e *Cymbopogon flexuosus*, avaliar o potencial inibitório sobre a enzima acetilcolinesterase e efeito repelente sobre carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato. Os óleos essenciais foram extraídos por hidrodestilação, caracterizados e quantificados quimicamente por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/MS) e Cromatografia Gasosa acoplada ao Detector de Ionização de Chamas (CG/FID). O efeito dos óleos essenciais em inibir a enzima AChE foi avaliado observando a taxa de formação do composto 5-tio-2-nitrobenzoato, composto produzido a partir da reação com o Reagente de Ellman (5,5-ditiobis-2-nitrobenzoico ou sua forma ionizada) com a tiocolina. O efeito repelente foi avaliado por ensaios de preferência empregando seis carrapatos adultos em jejum da espécie *Rhipicephalus sanguineus* s.l. (três machos e três fêmeas). Os componentes majoritários encontrados nos óleos essenciais foram borneol, γ -terpineol, carvacrol e p-cimeno (*Satureja montana* L.); sabineno, α -pineno e β -pineno (*Myristica fragrans* H.); e geranial e neral (*Cymbopogon flexuosus*). O maior potencial de inibição da acetilcolinesterase foi observado nos óleos de *Satureja montana* L. e *Myristica fragrans* H., apresentando valores de IC₅₀ próximos, respectivamente 0,024 e 0,023 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O índice de repelência foi maior para o óleo essencial de *Satureja montana* L., atingindo 60% de repelência na menor concentração testada. No ensaio com concentração constante e tempo de secagem variável, os óleos essenciais de *Satureja montana* L. e *Cymbopogon flexuosus* mostraram-se eficazes até 60 minutos após a aplicação. Os óleos essenciais foram promissores tanto na inibição da enzima AchE como repelentes de carrapatos da espécie *Rhipicephalus sanguineus* s.l., sendo o óleo de *Satureja montana* L. o mais eficaz entre os óleos essenciais avaliados, podendo ser indicado, mediante a mais estudos como um repente promissor.

Palavras-chave: produtos naturais, enzima, potencial biológico, ectoparasitos.

1 - INTRODUÇÃO

Doenças infecciosas podem ser transmitidas por carrapatos, que são ectoparasitos que se alimentam de sangue em pelo menos um estágio da vida (NAVA et al., 2010). Esses ectoparasitos são divididos em três grandes famílias: Ixodidae, Argasidae e Nuttalliellidae. A família dos carrapatos ixodídeos se destaca como importantes transmissores de patógenos de importância médica e veterinária, devido aos seus hábitos alimentares, pois os indivíduos se fixam no hospedeiro e permanecem ali por vários dias, favorecendo a transmissão de patógenos (SONENSHINE; ROE, et al., 2014). *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l.), o carrapato vermelho-do-cão se destaca dentre os membros da família Ixodidae por sua extensa distribuição mundial e sua capacidade de transmitir diversos patógenos, como *Babesia* spp., *Ehrlichia canis*, *Hepatozoon canis* e *Leishmania infantum* para seus hospedeiros principais, os canídeos (DANTAS-TORRES, 2008; DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2014; GUGLIELMONE et al., 2014), podendo ser considerado um vetor importante da bactéria *Rickettsia rickettsii* para humanos no Brasil (SERRA-FREIRE; SENA; BORSOI, 2011).

R. sanguineus s.l. é um parasito facilmente adaptado a altas temperaturas e, de acordo com Dantas-torres (2010), um aumento de 2 a 3 °C pode ser fator determinante para o aumento de casos de parasitoses transmitidas por esse parasito aos seres humanos. Nava et al. (2015) e Hekimoglu et al. (2016) consideram a existência de duas linhagens de *R. sanguineus* s.l., uma de regiões tropicais da América do Sul e África; outra de regiões temperadas da América do Sul e Europa Ocidental.

Os óleos essenciais, compostos provenientes do metabolismo secundário de plantas, apresentam diversas propriedades ecotoxicológicas favoráveis. Dentre essas, podem-se citar a relativa baixa toxicidade para seres humanos e o meio ambiente, a capacidade de degradação adicional. (TAK; JOVEL; ISMAN, 2017; JIA et al., 2018). Diante disso, os compostos extraídos de plantas se destacam como substâncias promissoras para o controle da infestação por carrapatos, sobretudo devido à sua capacidade repelente (BENELLI et al., 2016). Essas substâncias atuam impedindo que os parasitos alcancem e infestem os hospedeiros (McMAHON; KROBER; GUERIN, 2003).

Satureja montana L., *Myristica fragrans* H. e *Cymbopogon flexuosus* são plantas pertencentes a diferentes famílias, sendo Lamiaceae, Myristicaceae e Poaceae, respectivamente. Na composição dos óleos essenciais, são encontrados diferentes constituintes, dentre os quais podem-se citar os terpenos, terpenoides e fenilpropanoides (LÜCKER, 2002;

SIMOES et al., 2007; BAKKALI et al., 2008). Os metabólitos secundários têm funções ecológicas específicas tanto atrativas quanto repelentes para insetos e outros animais (FILHO et al., 2017; DELORY et al., 2016).

Óleos essenciais com atividade acaricida e inseticida atuam por diferentes mecanismos de ação, sendo a inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) um importante alvo desses compostos, pois sua inibição ocasiona o acúmulo de acetilcolina e conseqüentemente a morte do parasito (RIBEIRO et al., 2012). A AChE é uma enzima neuronal essencial em sinapses colinérgicas e junções neuromusculares nos vertebrados e invertebrados. Sua principal função é a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh), resultando em regulação da neurotransmissão (MUTERO; FOURNIER, 1992). A AChE é alvo de pesticidas organofosforados e carbamato no controle de pragas. Devido ao uso indiscriminado de pesticidas, ocorre a seleção de muitos parasitos resistentes (LEE et al., 2015). Diante disso, torna-se necessária a busca por novas substâncias com potencial acaricida e inseticida, sendo os inibidores da AChE compostos de grande potencial biocida em insetos e carrapatos.

Dessa forma, objetivou-se neste estudo extrair e caracterizar os óleos essenciais de *Satureja montana* L. (segurelha), *Myristica fragrans* H. (noz-moscada) e *Cymbopogon flexuosus* (capim-indiano), bem como avaliar o potencial inibitório sobre a enzima acetilcolinesterase e a atividade repelente desses óleos essenciais sobre carrapatos *R. sanguineus* s.l. em jejum.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

O material vegetal foi adquirido no mês de julho de 2018, sendo as folhas de *Satureja montana* L. obtidas no Mercado Municipal de Belo Horizonte - MG/Brasi; as sementes de *Myristica fragrans* H. no comércio de Lavras – MG/Brasil; e as folhas frescas de *Cymbopogon flexuosus* coletadas no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras (UFLA), situada na cidade de Lavras – MG/Brasil.

Carrapatos

Foram utilizados carrapatos adultos em jejum da espécie *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s. l.), da linhagem tropical, provenientes de colônia mantida em criação experimental em coelhos brancos da raça Nova Zelândia, no Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária da UFLA. Os coelhos nunca tiveram contato prévio com substâncias acaricidas ou repelentes. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFLA (Protocolo 043/185 de 24/05/2018).

Extração dos óleos essenciais

Os óleos essenciais foram extraídos por hidrodestilação, utilizando um aparelho de Clevenger modificado adaptado a um balão de fundo redondo com capacidade de 6 litros, por 2 h. O hidrolato obtido foi centrifugado em centrífuga de cruzeta horizontal (Fanem Baby I Modelo 206 BL), a 965.36 x g por quinze minutos. O óleo essencial de cada planta foi coletado com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, acondicionado em frasco de vidro e armazenado ao abrigo de luz e calor. (ANVISA, 2010).

Determinação da umidade das plantas e rendimento dos óleos essenciais

O teor de umidade dos óleos essenciais foi realizado conforme metodologia descrita por Pimentel et al. (2006), empregando o aparelho de Dean Stark. Foram adicionados 5 g do material vegetal fresco a 80 mL de ciclohexano em um balão de fundo redondo, de 250 mL. A mistura permaneceu em aquecimento por 2 horas, depois foi medido o volume de água presente no material vegetal. O rendimento das extrações dos óleos essenciais foi determinado em porcentagem peso/peso (% p/p) em base livre de umidade (BLU).

Análise qualitativa e quantitativa dos óleos essenciais

Os componentes químicos foram identificados por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM), utilizando-se um aparelho Shimadzu, modelo QP 5050A, condições: coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm) com fase ligada DB5 (5% fenil, 95% dimetilpolisiloxano) (0,25 µm de espessura de filme); o gás de arraste utilizado foi o

hélio, com fluxo de saída $1,0 \text{ mL min}^{-1}$; o volume da amostra injetada foi de $0,1 \text{ }\mu\text{L}$, diluída em hexano; a taxa de partição foi de 1:20 e pressão na coluna de $71,0 \text{ kPa}$; a temperatura do forno foi programada para $60 \text{ }^\circ\text{C}$, 1 min, aumentando até $246 \text{ }^\circ\text{C}$ ($3^\circ \text{ C min}^{-1}$), depois a $10 \text{ }^\circ\text{C}$ até atingir $300 \text{ }^\circ\text{C}$, por 7 min; A temperatura do injetor e detector foram de $220 \text{ }^\circ\text{C}$ e $240 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente. As condições do espectrômetro de massas foram: detector de varredura 1.000; intervalo de varredura de 0,50 fragmentos e fragmentos detectados na faixa de 45 a 500 Da. Para fins de comparação dos índices de retenção dos constituintes, foram empregados dados da literatura (ADAMS, 2017). O índice de retenção foi calculado utilizando-se a equação de Van den Dool e Kratz (1963) em relação a uma série homóloga de n-alcenos ($n\text{C}_9$ - $n\text{C}_{18}$). Também foram utilizadas duas bibliotecas NIST107 e NIST21, para comparação dos espectros.

As análises quantitativas foram realizadas por cromatografia gasosa utilizando um detector de ionização de chamas (FID), Shimadzu CG-17A. As condições de análise foram as mesmas utilizadas para CG-MS e a quantificação de cada constituinte foi obtida por meio da normalização de áreas (%).

Inibição da enzima acetilcolinesterase

A análise visou ao monitoramento da taxa de formação do composto 5-tio-2-nitrobenzoato (adaptado de Ellman et al., 1961). Esse composto é produzido a partir da reação do Reagente de Ellman (ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoico ou sua forma ionizada) com a tiocolina. A tiocolina é catalisada pela enzima AChE ($0,04 \text{ U mL}^{-1}$; tipo VI-S) de *Electrophorus electricus*. E a formação do composto cromóforo 5-tio-2-nitrobenzoato é indicada pela mudança na coloração da solução para amarelo.

A princípio, em um tubo de ensaio, foram adicionados $2970 \text{ }\mu\text{L}$ de tampão Tris-HCl (pH 8,0) e $254 \text{ }\mu\text{L}$ da solução de AChE e essa mistura foi incubada a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 5 minutos. Decorrido esse tempo, $25 \text{ }\mu\text{L}$ do óleo essencial em diferentes concentrações (100; 50,0; 10,0; 5,00; 1,00; 0,50; $0,25 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$); $100 \text{ }\mu\text{L}$ da solução de reagente de Ellman e $80 \text{ }\mu\text{L}$ da solução de substrato foram adicionados ao tubo de ensaio. A mistura foi novamente incubada a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 minutos. Após incubação, a absorbância foi medida em espectrofotômetro no comprimento de 412 nm .

Índice de repelência

O procedimento foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Bissinger et al. (2009) em ambiente climatizado, ao abrigo da luz, com temperatura de 27 °C e umidade relativa de 70%. Para o teste, um filtro de papel circular foi colocado em uma placa de Petri de área 63,6 cm². Para o grupo controle, em uma metade do filtro (31,8 cm²), foram adicionados 200 µL de água destilada em dez pontos equidistantes; na outra metade, o mesmo procedimento foi realizado com 200 µL de uma solução de DMSO a 3%. Os filtros foram secos em capela de exaustão por 30 minutos, anteriormente ao teste. Em seguida, seis carrapatos adultos em jejum da espécie *R. sanguineus* s.l. (três machos e três fêmeas) foram adicionados ao centro da placa e suas posições foram avaliadas após cinco minutos. Dez replicatas foram realizadas para o grupo controle e para cada tratamento, totalizando 60 indivíduos por grupo. O procedimento foi repetido para os tratamentos empregando-se 200 µL dos óleos essenciais diluídos em DMSO a 3% nas seguintes concentrações: 7,0; 14,0; 28,0 e 56,0 µL mL⁻¹. Para a maior concentração (56,0 µL mL⁻¹) dos óleos essenciais, também foram avaliados diferentes tempos de secagem, conforme segue: 60, 120 e 180 minutos após a aplicação do produto.

O Índice de Repelência (IR) dos óleos essenciais utilizados foi calculado de acordo com a equação 1 (GIRÃO FILHO et al. 2014; XAVIER et al., 2015). Os valores do índice variam de 0 a 2, sendo IR < 1,0 (tratamento repelente), IR > 1,0 (tratamento atraente) e IR = 1,0 (tratamento neutro). O intervalo de segurança utilizado para considerar se o óleo essencial é ou não repelente foi obtido a partir da média dos IR e do respectivo erro padrão (EP).

$$IR = 2G / (G + P) \quad \text{Equação 1}$$

em que G = % de ácaros atraídos no tratamento e P = % de ácaros atraídos na testemunha.

Análise estatística

Para a comparação múltipla dos índices de repelência dos óleos essenciais de *S. montana* L., *M. fragrans* H. e *C. flexuosus* sobre *R. sanguineus* s.l., os dados foram

submetidos à análise de variância com aplicação do Bonferroni a 5 % de probabilidade no programa estatístico SISVAR (FERREIRA; 2011).

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Determinação da umidade das plantas e do rendimento dos óleos essenciais

Os resultados obtidos para o teor de umidade e o rendimento das extrações dos óleos essenciais de *S. montana* L., *M. fragrans* H. e *C. flexuosus* estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Teor de umidade e rendimento dos óleos essenciais de *S. montana* L., *M. fragrans* H. e *C. flexuosus*.

Plantas	Massa (g)	Umidade (%)	Rendimento (%)
<i>Satureja montana</i> L.	300	9,27	0,47
<i>Myristica fragrans</i> H.	143	3,55	5,14
<i>Cymbopogon flexuosus</i>	200	54,40	1,39

O óleo essencial de *S. montana* apresentou uma baixa umidade (9,27%) e um baixo rendimento (0,47%). Millezi et al. (2014), Elgndi et al. (2017) e Sojic et al. (2019) relataram em suas pesquisas rendimento da extração do óleo essencial obtido das folhas de *S. montana*, variando de 1,15-1,48; enquanto Silva et al. (2015) corroboram com o presente trabalho com um rendimento de 0,59%, valor bem próximo do observado no trabalho em questão. As variações no rendimento e na composição química dos óleos essenciais se devem a vários fatores, como variação sazonal, geográfica e climática, estágio generativo, qualidade do solo e condições de secagem, às quais o material vegetal está exposto (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

O óleo essencial de *M. fragrans*, por sua vez, apresentou um elevado rendimento, 5,14%. Matulyte et al. (2019) encontraram um valor próximo, 5,25%. Porém, os autores sugeriram que o uso de 2% de aluminometasilicato de magnésio pode aumentar o rendimento do óleo essencial quase duas vezes (10,43%), já que valores elevados de rendimento dificilmente são encontrados. Em comparação ao rendimento do óleo essencial de *S. montana*, o rendimento do óleo essencial de *C. flexuosus* também foi significativo, sendo de 1,39%.

Caracterização química dos óleos essenciais

A composição química dos óleos essenciais de *S. montana*, *M. fragrans* e *C. flexuosus* está apresentada na Tabela 2, com destaque para os componentes majoritários presentes em cada óleo essencial.

Tabela 2 - Composição dos óleos essenciais de *S. montana* L., *M. fragrans* H. e *C. flexuosus*.

IR	Constituintes	% dos constituintes		
		<i>S. montana</i> L.	<i>M. fragrans</i> H.	<i>C. flexuosus</i>
1522	δ -cadineno	0,3489	-	-
1008	δ -careno	-	0,6270	-
1283	Acetato de isobornil	1,7906	-	-
1439	Aromadendreno	0,2160	-	-
1165	Borneol	36,1825	-	-
946	Canfeno	5,3505	0,1666	-
1141	Cânfora	1,2358	-	-
1298	Carvacrol	11,0739	-	-
1577	Espatuleno	0,4706	-	-
1026	Eucaliptol	0,8958	-	-
1270	Geranial	-	-	59,6629
1484	Germacreno D	0,1540	-	-
1065	Hidrato de cis-sabineno	0,1901	0,6210	-
1098	Hidrato de trans-sabineno	-	0,5338	-
1024	Limoneno	0,5580	10,1507	-
1095	Linalol	1,5852	-	1,3601
988	Mirceno	-	1,5554	-
1240	Neral	-	-	38,9770
-	NI	2,0416	-	-
1582	Óxido de cariofileno	1,3486	-	-
969	Sabineno	-	49,2273	-
1174	Terpinen-4-ol	2,0146	4,9989	-
1086	Terpinoleno	-	0,7898	-
1417	Trans, β -cariofileno	2,4136	-	-
921	Triciclono	0,2129	-	-
1374	α -copaeno	0,1515	-	-
1002	α -felandreno	-	0,5842	-
932	α-pineno	3,1160	13,8070	-
1014	α -terpineno	0,2915	1,3777	-
924	α -tujeno	0,1065	1,8675	-
1387	β -bourboneno	0,0922	-	-
974	β-pineno	0,3428	10,7519	-
1513	γ -cadineno	0,3093	-	-
1054	γ -terpineno	0,6151	2,2219	-
1199	γ-terpineol	12,6643	-	-
1020	p-cimeno	9,5736	0,7194	-

Vitanza et al. (2019) caracterizaram carvacrol (43,9%), p-cimeno (15,3%) e timol (7,6%) como compostos majoritários no óleo essencial de *S. montana*. Silva et al. (2015) e Millezi et al. (2014) também identificaram os mesmos componentes majoritários; porém, em concentrações diferentes. Os valores encontrados por Silva et al. (2015) foram 32,85% de timol, 14,35% de carvacrol, 12,12% de p-cimeno e 8,99% de linalol. No entanto, Millezi et al. (2014) observaram 15,47% de timol, 11,5% de p-cimeno e 9,81% de carvacrol como majoritários do óleo essencial de *S. montana*. Os compostos majoritários encontrados por esses autores não corroboram com os majoritários encontrados no presente trabalho.

Matulyte et al. (2019), analisando a composição do óleo essencial de sementes de *M. fragrans* por GC-EM, encontraram β -pineno (26,61%), α -pineno (8,27%), 4-careno (7,77%), hidrato de cis-sabineno (7,76%) e sabineno (6,53%). Soni et al. (2016) também observaram a presença de β -pineno (20,69%), α -pineno (15,16%), além de α -tujeno (12,73%) e p-ment-1-en-4-ol (11,03%). Entretanto, López et al. (2015) identificaram como majoritários miristicina (64,5%), ácido mirístico (18,7%), terpinen-4-ol (8,8%) e metoxieugenol (8,1%), constituintes bem diferentes dos observados por Matulyte et al. (2019) e Soni, Sharma; Jasuja (2016), e também daqueles encontrados no presente trabalho. Da Rocha Voris et al. (2018), por sua vez, relataram a presença de sabineno (52,1%), α -pineno (12,8%), terpinen-4-ol (10,7%) e limoneno (6,2%), sendo a maioria dos constituintes semelhantes aos valores encontrados no presente trabalho.

Gündel et al. (2018) e Rossi et al. (2017), verificando a composição do óleo essencial de *C. flexuosus*, encontraram os mesmos resultados do presente estudo, geranial (46%) e neral (34%). Todavia, Azevedo et al. (2016) encontraram os mesmos constituintes; porém, em quantidades diferentes: geranial (43,62%) e neral (33,80%). De acordo com os valores encontrados pelos autores citados acima, eles se encontram em quantidade inferior aos encontrados no presente trabalho.

Inibição da acetilcolinesterase

Os óleos essenciais revelaram um pequeno potencial inibitório sobre a ação da AChE. Os valores de IC₅₀ podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3 - Valores de IC₅₀ para a inibição de acetilcolinesterase.

Amostras	IC ₅₀ (µg mL ⁻¹)
Carvacrol	0,012b
<i>Satureja montana</i> L.	0,024a
<i>Myristica fragrans</i> H.	0,023a
<i>Cymbopogon flexuosus</i>	> 0,1*

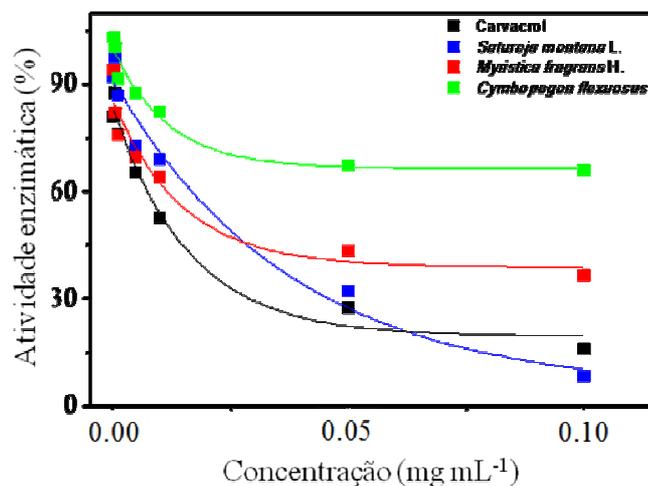
As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas não diferem entre si pelo Teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

*Valor elevado, não foi possível calcular.

A concentração inibitória média (IC₅₀) corresponde à quantidade de óleo essencial suficiente para reduzir a atividade enzimática em 50%. Quanto menor for o valor de IC₅₀, melhor é o potencial de inibição da AChE pelo óleo essencial avaliado (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET; 1995). Os óleos essenciais de *S. montana* e *M. fragrans* apresentaram pequeno potencial inibitório, com IC₅₀ de 0,024 e 0,023 (µg mL⁻¹), respectivamente, valores estatisticamente diferentes do composto carvacrol, utilizado como controle. Na Figura 1, as porcentagens de atividade enzimática podem ser observadas e correlacionadas com os valores de IC₅₀, na qual é possível verificar um decréscimo exponencial da atividade enzimática com o aumento das concentrações.

Nos óleos essenciais estudados, apenas o óleo de *S. montana* apresentou o carvacrol em sua composição. Na figura abaixo, pode ser observado que a diminuição da atividade enzimática é similar à curva padrão (carvacrol).

Figura 1 - Porcentagens de atividade enzimática para os óleos essenciais de *Satureja montana* L., *Myristica fragrans* H. e *Cymbopogon flexuosus*.



Benabdallah et al. (2018) observaram que o óleo essencial de *Mentha arvensis*, que continha 59,05% de monoterpenos oxigenados, foi o mais eficiente dentre os óleos testados contra a AChE ($IC_{50} = 27,5 \mu\text{g mL}^{-1}$). Anteriormente, Miyazawa et al. (1998), ao avaliarem óleos essenciais de espécies do gênero *Mentha* do Japão, observaram que os monoterpenos oxigenados são importantes inibidores da AChE. Öztürk (2012) que trabalhou com outras espécies de plantas (*Satureja thymbra* e *Salvia lavandulaefolia*), também observou propriedades anticolinesterásicas de monoterpenos oxigenados (1,8-cineol e cânfora). Os óleos essenciais estudados neste trabalho com maior potencial para inibição da acetilcolinesterase foram aqueles obtidos de *S. montana* e *M. fragrans*, que apresentaram monoterpenos oxigenados (borneol e γ -terpineol) e monoterpenos hidrocarbonados (sabineno e α -pineno) e monoterpenos aromáticos (p-cimeno e carvacrol) em sua composição, respectivamente.

Índice de repelência

Os índices de repelência para diferentes concentrações e para uma mesma concentração com diferentes tempos de secagem estão descritos nas Tabelas 3 e 4, respectivamente. As porcentagens de repelência podem ser observadas nas Figuras 2 e 3.

O óleo essencial de *S. montana* mostrou melhores resultados em relação aos demais óleos essenciais, sendo que, na concentração de $14 \mu\text{L mL}^{-1}$ (T2), o óleo apresentou IR significativamente menor (Tabela 1) que os demais na mesma concentração. Também foi observado que não houve diferença significativa no IR para as concentrações 14, 28 e $56 \mu\text{L mL}^{-1}$ do óleo essencial de *S. montana*. Desse modo, ao se utilizar apenas $14 \mu\text{L mL}^{-1}$ do produto, foi possível observar elevada repelência. Os dados são corroborados pelo percentual de repelência, conforme observado na Figura 2. De fato, a concentração de $14 \mu\text{L mL}^{-1}$ do óleo foi suficiente para causar uma repelência superior a 80%.

Tabela 4 - Índices de repelência em diferentes concentrações dos óleos essenciais de *S. montana* L., *M. fragrans* H. e *C. flexuosus* sobre *R. sanguineus* sensu lato.

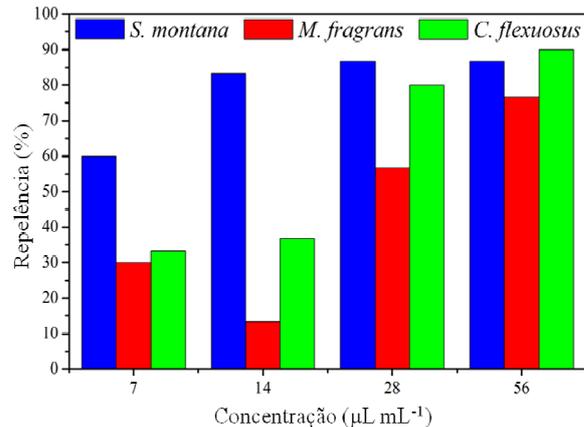
Tratamentos	<i>S. montana</i> L.		<i>M. fragrans</i> H.		<i>C. flexuosus</i>	
	IR ± EP*	Classif.**	IR ± EP*	Classif.**	IR ± EP*	Classif.**
Controle	0.90 ± 0.14 Aa	Neutro	0.90 ± 0.14 Aa	Neutro	0.90 ± 0.14 Aa	Neutro
T1 (7)	0.40 ± 0.10 Bb	Repelente	0.87 ± 0.08 Aa,b	Repelente	0.67 ± 0.21 A,Ba	Repelente
T2 (14)	0.17 ± 0.09 Bb	Repelente	0.70 ± 0.18 Aa,b	Repelente	0.63 ± 0.09 Aa,b	Repelente
T3 (28)	0.13 ± 0.05 Ab	Repelente	0.43 ± 0.07 Ab,c	Repelente	0.20 ± 0.07 Ab,c	Repelente
T4 (56)	0.13 ± 0.05 Ab	Repelente	0.23 ± 0.09 Acb	Repelente	0.10 ± 0.05 Ac	Repelente

*IR ± EP Índice de repelência mais ou menos erro padrão.

**Classificação

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e mesma letra maiúscula nas linhas não diferem significativamente pelo Teste de Bonferroni ($p \leq 0,05$).

Figura 2 - Porcentagens de repelência em diferentes concentrações observadas para os óleos essenciais de *S. montana* L., *M. fragrans* H. e *C. flexuosus* sobre *R. sanguineus* sensu lato.



Foi observado que quanto maior o tempo de secagem das amostras de *M. fragrans* e *C. flexuosus*, maior o IR, ou seja, menor sua ação repelente, sendo que o óleo de *C. flexuosus* apresentou efeito neutro após 3 horas de aplicação. Importante destacar que, embora classificados como repelentes segundo metodologia proposta por Girão-Filho et al. (2014) e Xavier et al. (2015), os grupos T2, T3 e T4 não apresentam IR estatisticamente diferente do controle para *M. fragrans*, ao passo que T3 também não demonstrou diferença estatística no IR em relação ao controle para *C. flexuosus* (Tabela 5).

O óleo de *S. montana* apresentou índices de repelência estatisticamente iguais, independentemente do tempo avaliado (Tabela 5). Sugere-se o potencial do óleo essencial de *S. montana* em ser empregado com o objetivo de obter um efeito repelente em longo prazo quando se emprega a concentração de 56 µL mL⁻¹.

A diferença no percentual de repelência (Figura 3) mostra o potencial de volatilidade de cada óleo essencial. Uma baixa volatilidade foi observada para o óleo essencial de *S.*

montana, pois, em 180 minutos, ainda mostrava uma porcentagem de repelência acima de 60%.

Tabela 5- Índices de repelência em concentração constante dos óleos essenciais de *S. montana* L., *M. fragrans* H. e *C. flexuosus* em diferentes tempos sobre *R. sanguineus* sensu lato.

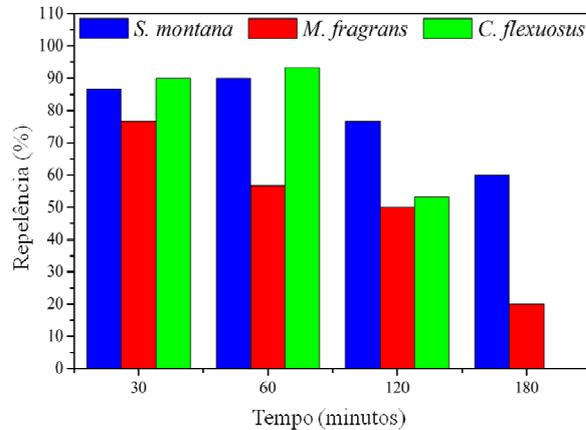
Tratamentos	<i>S. montana</i> L.		<i>M. fragrans</i> H.		<i>C. flexuosus</i>	
	IR ± EP*	Classif.**	IR ± EP*	Classif.**	IR ± EP*	Classif.**
Controle	0.90 ± 0.14 Aa	Neutro	0.90 ± 0.14 Aa	Neutro	0.90 ± 0.14 Aa,b	Neutro
T1 (30)	0.13 ± 0.05 Ab	Repelente	0.23 ± 0.09 Ab	Repelente	0.10 ± 0.05 Ac	Repelente
T2 (60)	0.10 ± 0.07 Ab	Repelente	0.43 ± 0.07 Aa,b	Repelente	0.07 ± 0.04 Ac	Repelente
T3 (120)	0.23 ± 0.10 Ab	Repelente	0.50 ± 0.10 Aa,b	Repelente	0.47 ± 0.16 Ab,c	Repelente
T4 (180)	0.40 ± 0.15 Bb	Repelente	0.80 ± 0.13 Aa	Repelente	1.03 ± 0.22 Aa	Neutro

*IR ± EP Índice de repelência mais ou menos erro padrão

**Classificação

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e mesma letra maiúscula nas linhas não diferem significativamente pelo Teste de Bonferroni ($p \leq 0,05$).

Figura 3 - Porcentagens de repelência em concentração constante observadas para os óleos essenciais de *Satureja montana* L., *Myristica fragrans* H. e *Cymbopogon flexuosus* em diferentes tempos sobre *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato.



Os óleos essenciais são misturas que podem apresentar efeitos tóxicos e repelentes contra vetores e pragas de artrópodes (PAVELA et al., 2016).

De acordo com a literatura, alguns constituintes isolados de óleo essencial podem apresentar efeito repelente para determinadas espécies de ácaros; por exemplo, o limoneno, carvona (LIMA et al., 2016) e eugenol (TABARI et al., 2017; ZERINGOTA et al., 2013) repelem *Rhipicephalus microplus*. Segundo Politi et al. (2012), o limoneno também apresenta efeito repelente sobre *R. sanguineus* s.l. No presente estudo, esse constituinte foi encontrado no óleo essencial de *M. fragrans*, e foi observado um potencial repelente significativo nas duas

maiores concentrações, infere-se, portanto, que a quantidade de limoneno no óleo essencial pode ter influenciado na atividade.

4 – CONCLUSÃO

Os componentes majoritários encontrados nos óleos essenciais foram borneol, γ -terpineol, carvacrol e p-cimeno (*Satureja montana* L.); sabineno, α -pineno e β -pineno (*Myristica fragrans* H.); e geranial e neral (*Cymbopogon flexuosus*).

Os óleos essenciais foram promissores na inibição da enzima AchE e como repelentes de carrapatos da espécie *Rhipicephalus sanguineus* s.l., sendo o óleo de *Satureja montana* L. com maior atividade repelente.

AGRADECIMENTOS

Ao apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) na forma da Bolsa de Produtividade e recursos financeiros; à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), e à Fundação de Amparo em Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig) pelo apoio financeiro.

5 - REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4. ed. Carol Stream: Allure, 2017; 804 p.
- AZEVEDO, I. L. et al. Eficácia *in vitro* do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon flexuosus* steud. wats.) frente a bactérias entéricas de origem avícola. **Acta Veterinária Brasileira**, v. 10, n. 1, p. 25-31, 2016.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, Feb, 2008.
- BENABDALLAH, A. et al. Chemical composition, antioxidant activity and acetylcholinesterase inhibitory of wild *Mentha* species from northeastern Algeria. **South African Journal of Botany**, v. 116, p.131-139, 2018.
- BENELLI, G. et al. Tick repellents and acaricides of botanical origin: a green roadmap to control tick-borne diseases? **Parasitology Research**, v. 115, n. 7, p. 2545-2560, 2016.
- BISSINGER, B. W. et al. Efficacy of the new repellent BioUD® against three species of ixodid ticks. **Exp. Appl. Acarol.**, v. 48, p. 239-250, 2009.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v.28, p.25-30, 1995.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopéia brasileira**. 5. ed. Brasília, 2010. p. 198-199.
- DA ROCHA VORIS, D. G. et al. Evaluation of larvicidal, adulticidal, and anticholinesterase activities of essential oils of *Illicium verum* Hook. f., *Pimenta dioica* (L.) Merr., and *Myristica fragrans* Houtt. Against Zika virus vectors. **Environ. Sci. Pollut. Res.** v. 25, p. 22541-22551, 2018.
- DANTAS-TORRES F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. **Vet Parasitol**, v. 152, p. 173-185, 2008.
- DANTAS-TORRES, F. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasites & Vectors**, v. 3, n. 1, p. 26, 2010.
- DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Dogs, cats, parasites, and humans in Brazil: opening the black box. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 1, 2014.
- DELORY, B. M. et al. Root-emitted volatile organic compounds: can they mediate belowground plant-plant interactions? **Plant and Soil**, v. 402, n. 1, p.1-26, 2016.
- ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination acetylcholinesterase activity. **Biochem. Pharmacol.**, v. 7, p. 88-95, 1961.

- ELGNDI, M. A. et al. Antioxidative and cytotoxic activity of essential oils and extracts of *Satureja montana* L., *Coriandrum sativum* L. and *Ocimum basilicum* L. obtained by supercritical fluid extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 128, p. 128-137, 2017.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, Nov./ Dez. 2011.
- FILHO, J. G. O. et al. Brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato, infestation of susceptible dog hosts is reduced by slow release of semiochemicals from a less susceptible host. **Ticks Tick-Borne Dis.** v. 8, p. 139-145, 2017.
- GIRÃO FILHO, J. E. et al. Repelência e atividade inseticida de pós vegetais sobre *Zabrotes subfasciatus* Boheman em feijão-fava armazenado. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.16, n.3, p.499-504, 2014.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES. N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.
- GUGLIELMONE, A. A. et al. Hard ticks (Acari: Ixodida: Ixodidae) of the world. **Springer Heidelberg**, 2014.
- GÜNDEL, S. S. et al. Nanoemulsions containing *Cymbopogon flexuosus* essential oil: Development, characterization, stability study and evaluation of antimicrobial and antibiofilm activities. **Microbial Pathogenesis**, v. 118, p. 268-276, 2018.
- HEKIMOGLU, O. et al. A new molecular data shed light on the global phylogeny and species limits of the *Rhipicephalus sanguineus* complex. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 7, n. 5, p. 798-807, 2016.
- JIA, M. et al. Chemical composition and acaricidal activity of *Arisaema anurans* essential oil and its major constituents against *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 261, p. 59-66, 2018.
- LEE, S. H. et al. Mutation and duplication of arthropod acetylcholinesterase: implications for pesticide resistance and tolerance. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v. 120, p. 118-124, 2015.
- LIMA, A. S. et al. Assessment of the repellent effect of *Lippia alba* essential oil and major monoterpenes on the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. **Med. Vet.**, v. 30, p. 73-77, 2016.
- LÓPEZ, V. et al. Anthelmintic effects of nutmeg (*Myristica fragans*) on *Anisakis simplex* L3 larvae obtained from *Micromesistius potassou*. **Research in Veterinary Science**, v. 100, p. 148-152, 2015.
- LÜCKER, J. **Metabolic engineering of monoterpene biosynthesis in plants**. Wageningen: Proefschrift Wageningen University, 2002. 158 p.

- MATULYTE, I. et al. GC-MS Analysis of the composition of the extracts and essential oil from *Myristica fragrans* seeds using magnesium aluminometasilicate as excipient. **Molecules**, v. 24, p. 1062, 2019.
- McMAHON, C., KRÖBER, T., GUERIN, P. M., In vitro assays for repellents and deterrents for ticks: differing effects of products when tested with attractant or arrestment stimuli. **Med. Vet. Entomol.**, v. 17, p. 370-378, 2003.
- MILLEZI, A. F. et al. Caracterização química e atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas condimentares e medicinais contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.16, n.1, p.18-24, 2014.
- MIYAZAWA, M. et al. Inhibition of acetylcholinesterase activity by essential oils of *Mentha* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 3431-3434, 1998.
- MUTERO, A., FOURNIER, D. Post-translational modifications of Drosophila acetylcholinesterase. In vitro mutagenesis and expression in *Xenopus oocytes*. **J. Biol. Chem.** v. 267, p. 1695-1700, 1992.
- NAVA, S. et al. Description of a New Argasid Tick (Acari: Ixodida) from Bat Caves in Brazilian Amazon. **Journal of Parasitology**, v. 96, n. 6, p. 1089-1101, 2010.
- NAVA, S. et al. The taxonomic status of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). **Veterinary Parasitology**, v. 208, p. 2-8, 2015.
- PAVELA, R. et al. Application of ethnobotanical repellents and acaricides in prevention, control and management of livestock ticks: A review. **Research in Veterinary Science**, v. 109, p. 1-9, 2016.
- 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.
- POLITI, F. A. S. et al. Acaricidal activity of ethanolic extract from aerial parts of *Tagetes patula* L. (Asteraceae) against larvae and engorged adult females of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). **Parasites & Vectors**, v. 5, p. 295, 2012.
- RIBEIRO, V. L. S. et al. Effect of *Calea serrata* Less. n-hexane extract on acetylcholinesterase of larvae ticks and brain Wistar rats. **Veterinary Parasitology**, v. 189, p. 322-326, 2012.
- ROSSI, G. G. et al. Antibiofilm activity of nanoemulsions of *Cymbopogon flexuosus* against rapidly growing mycobacteria. **Microbial Pathogenesis**, v. 113, p. 335-341, 2017.
- SERRA-FREIRE, N. M.; SENA, L. M. M.; BORSOI, A. B. P. Parasitismo humano por carrapatos na Mata Atlântica. **Entomobrasilis**, v. 4, n. 2, p. 67-72, 2011.
- SILVA, L. F. et al. Óleo essencial de *Satureja montana* L.: análise cromatográfica, determinação das atividades antioxidante e antifúngica. **E-xacta**, v. 8, n. 2, p. 55-63, 2015.

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

ŠOJIC, B. et al. Essential oil versus supercritical fluid extracts of winter savory (*Satureja montana* L.) – Assessment of the oxidative, microbiological and sensory quality of fresh pork sausages. **Food Chemistry**, v. 287, p. 280-286, 2019.

SONENSHINE, D. E.; ROE, R. M. **Biology of ticks**. New York: Oxford University Press, 2014.

SONI, R.; SHARMA, G.; JASUJA, N. D. Essential Oil Yield Pattern and Antibacterial and Insecticidal Activities of *Trachyspermum ammi* and *Myristica fragrans*. **Hindawi Publishing Corporation Scientifica**, 2016.

TABARI, M. A. et al. Toxic and repellent activity of selected monoterpenoids (thymol, carvacrol and linalool) against the castor bean tick, *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae). **Vet. Parasitol.**, v. 245C, p. 86-91, 2017.

TAK, J. H., JOVEL, E., ISMAN, M.B. Effects of rosemary, thyme and lemongrass oils and their major constituents on detoxifying enzyme activity and insecticidal activity in *Trichoplusia ni*. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v. 140, n. 9, 2017.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **J Chromatogr A**. 1963;11:463-471.

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.

XAVIER, M. V. A. et al. Toxicidade e repelência de extratos de plantas da caatinga sobre *Tetranychus bastosi* Tutler, Baker & Sales (Acari: Tetranychidae) em pinhão-mansão. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.17, n.4, supl. I, p.790-797, 2015.

ZERINGOTA, V. et al. Repellent activity of eugenol on larvae of *Rhipicephalus microplus* and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae). **Parasitol. Res.**, v. 112, p. 2675-2679, 2013.

**ARTIGO 2 - EFEITO BACTERICIDA E ANTIOXIDANTE DOS ÓLEOS
ESSENCIAIS DE *Satureja montana* L., *Myristica fragrans* H. E *Cymbopogon flexuosus***

RESUMO

A seleção de espécies bacterianas patogênicas resistentes aos antibióticos e o estresse oxidativo desencadeado no organismo durante processos infecciosos são fatores de preocupação na atualidade. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivos extrair e caracterizar óleos essenciais de *Satureja montana* L., *Myristica fragrans* H. e *Cymbopogon flexuosus*, bem como avaliar suas atividades antioxidante e antibacteriana. Os óleos essenciais foram identificados por GC/MS e quantificados por normalização de área por GC/FID. O potencial antibacteriano contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* foi avaliado por ensaios de susceptibilidade celular e por análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). A avaliação da atividade antioxidante foi baseada nos ensaios de estabilização dos radicais DPPH, branqueamento de β -caroteno e poder redutor. O óleo essencial de *Satureja montana* L. apresentou como constituintes majoritários borneol, γ -terpineol e carvacrol, ao passo que na espécie *Myristica fragrans* H., foram encontrados os constituintes sabineno e α -pineno como majoritários. Os isômeros geranial e neral (citral) foram os únicos majoritários do óleo essencial de *Cymbopogon flexuosus*. O óleo essencial de *Satureja montana* L. foi eficaz sobre *E. coli*, com concentração mínima inibitória e bactericida (CMI e CMB) de $6,25 \mu\text{L mL}^{-1}$, enquanto *Cymbopogon flexuosus* apresentou potencial bactericida sobre ambos os microrganismos CMI = $6,25 \mu\text{L mL}^{-1}$ para *S. aureus* e CMB = $12,5 \mu\text{L mL}^{-1}$ para *E. coli*. Todos os óleos essenciais avaliados causaram danos à membrana e parede celular dos microrganismos. Os óleos essenciais de *Satureja montana* L. e *Myristica fragrans* H. exibiram um significativo efeito protetor de substratos lipídicos pelo ensaio de branqueamento de β -caroteno. Em geral, os óleos essenciais investigados podem ser promissores no combate a bactérias patogênicas e na proteção de biomoléculas durante o estresse oxidativo em quadros de toxinfecção.

Palavras-chave: produtos naturais, estresse oxidativo, toxinfecção, antibióticos naturais.

1 - INTRODUÇÃO

Microrganismos como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* são naturalmente parte da microbiota do intestino e de células epiteliais nasais. Entretanto, tornam-se um problema quando colonizadas em diferentes órgãos, desencadeando infecções e surtos toxinfecções. A contaminação por esses microrganismos ocorre principalmente pela ingestão de alimentos contaminados por falta de boas práticas de manipulação (ANVISA, 2010). Algumas linhagens de *E. coli* podem causar gastroenterite e afetar o trato urinário (GAYTÁN et al., 2016; KOTLOFF et al., 2013). Já a contaminação por *S. aureus* acarreta infecções de pulmonares, gastroenterite, meningite, síndrome do choque tóxico e infecções do trato urinário (TAYLOR; UNAKAL, 2017). Uma das respostas imunes naturais do indivíduo infectado é a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) para degradar os microrganismos, levando-os à lise celular (ZHAO; DRLICA, 2014; THARMALINGAM et al., 2017). No entanto, a formação de radicais livres pelo hospedeiro leva a um quadro de estresse oxidativo, que se não controlado, contribui para o desenvolvimento de uma série de patologias (AMORATI; FOTI; VALGIMIGLI, 2013; OLSZOWY et al., 2019; THARMALINGAM et al., 2017). Assim, no controle e tratamento de doenças infecciosas, é desejável que se utilizem fármacos que possam inibir e eliminar a proliferação desenfreada de microrganismos e controlar o quadro de estresse oxidativo.

A administração de antibióticos é o principal tratamento indicado em casos de infecções causadas por microrganismos patogênicos. Entretanto, o uso intenso e indiscriminado desses fármacos tem favorecido o desenvolvimento de cepas bacterianas resistentes (CANIÇA et al., 2019). O mecanismo pelo qual cepas resistentes são selecionadas ainda é tema de muitos estudos (MANDAL et al., 2015; PARJIT; PETERSON, 2018; SINGH et al., 2019). Entretanto, teorias associam o processo a habilidades adaptativas das colônias bacterianas, em modificar seu genoma por mutação, ou incorporar genes provenientes de outros microrganismos por diferentes sistemas de transferência genética, o que leva a uma resposta rápida às mudanças ambientais (SANDOVAL-MOTTA; ALDANA, 2016). Existem, também, debates em relação ao efeito do estresse oxidativo na seleção de cepas bacterianas resistentes (ZHAO; DRLICA, 2014; THARMALINGAM et al., 2017; MARTELLI; GIACOMINI, 2018). Essa problemática tem impulsionado a pesquisa no sentido de encontrar melhores estratégias no tratamento de doenças infecciosas causadas por bactérias patogênicas;

seja pela utilização dos antibióticos conhecidos e administrados consecutivamente, pelo descobrimento e isolamento de antibacterianos a partir de culturas de microrganismos ou pelo desenvolvimento de novos fármacos de origem natural com complexa e variável constituição química (SIDDIQUE; PARVEEN; MAZHAR, 2017; MARTELLI; GIACOMINI, 2018).

Nesse cenário, os óleos essenciais vêm ganhando espaço por serem metabólitos secundários produzidos pelas plantas como resposta adaptativa ao meio em que estão inseridas. São misturas complexas de terpenos e fenilpropanoides com diferentes propriedades biológicas, o que dificulta o processo de seleção de cepas bacterianas resistentes (BAKKALI et al., 2008). Além disso, por serem ricos em compostos fenólicos, os óleos essenciais podem atuar no organismo infectado, neutralizando as espécies reativas de oxigênio e demais radicais livres, revertendo o quadro de estresse oxidativo causado durante processos infecciosos (BAKKALI et al., 2008; THARMALINGAM et al., 2017). Diversos trabalhos têm sido desenvolvidos avaliando o efeito conjunto, antibacteriano e antioxidante, dos óleos essenciais e existem relatos de efeitos bacteriostáticos e bactericidas e em relação à integridade estrutural de membranas celulares contra os patógenos transmitidos por alimentos, além de promissora atividade antioxidante (SIDDIQUE et al., 2017; CAI et al., 2019; BORAH et al., 2019). Assim, objetivou-se neste trabalho avaliar o potencial antioxidante e antibacteriano dos óleos essenciais extraídos de *Satureja montana* L. (segurelha), *Myristica fragrans* H. (noz-moscada) e *Cymbopogon flexuosus* (capim indiano).

2 - MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do Material Vegetal e Extração dos Óleos Essenciais

As folhas de *Satureja montana* L. foram obtidas no Mercado Municipal de Belo Horizonte - MG/Brasil. As sementes de *Myristica fragrans* H., no comércio de Lavras - MG/Brasil, e o *Cymbopogon flexuosus* foi coletado no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras (UFLA), situada na cidade de Lavras - MG/Brasil. O material vegetal (250 g) foi colocado em um balão de fundo redondo com 2500 mL de água destilada e submetido à hidrodestilação por 2 horas em um aparelho de Clevenger modificado, seguindo metodologia descrita pela ANVISA, 2010.

Identificação e Quantificação dos Óleos Essenciais

Os compostos foram identificados por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas, CG/MS, (Shimadzu, QP5050A) usando uma coluna capilar de sílica fundida com fase ligada DB-5 (30 m; 0,25 mm; 0,25 mm) e hélio como gás de arraste a um fluxo de 1,18 mL min⁻¹. Foram injetados 1µL de óleos essenciais, diluídos em hexano (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) a uma taxa de partição de 1:100; a proporção de divisão do volume injetado foi de 1:20 e a pressão na coluna de 71,0 kPa. A programação de temperatura no forno variou de 60 °C a 240 °C a uma taxa de 3 °Cmin⁻¹, aumentando de 10 °C min⁻¹ até atingir 300 °C, sendo mantido constante por 7 min. A temperatura do injetor, interface GC/MS e da fonte de íons foram de 220 °C, 240 °C, e 200 °C, respectivamente. Os espectros de massas foram obtidos por impacto de elétrons (70 eV), no modo *scan* (45 a 350 Da), a uma velocidade de varredura de 1000 unidade e intervalo de varredura de 0,50 fragmentos, com um corte de solvente em 3 min.

Os compostos foram identificados por comparação dos espectros de massas obtidos com espectros de massas fornecidos pelo banco de dados do *software* (Wiley 8 e FFNSC 1.2) e quantificados por normalização de área (%) por cromatografia em fase gasosa acoplada a detector de ionização de chama, CG/FID, (Shimadzu CG - 17A) nas mesmas condições utilizadas em CG/MS. Para o cálculo do índice de retenção, foi utilizada a equação de Van den Dool e Kratz (1963) em relação à série homóloga de n-alcenos (nC8-nC18) e comparado com índices de retenção da literatura, segundo Adams (2017).

Atividade Antibacteriana - Cultivo e manutenção dos inóculos

A atividade antibacteriana foi realizada sobre cepas bacterianas de *Escherichia coli* ATCC 11229 e *Staphylococcus aureus* ATCC 13565. As culturas foram ativadas em caldo (BHI) com incubação a 37 °C por 24 horas. Em seguida, foram transferidas para um tubo com 10 mL de caldo de soja triptica (TSB) e incubados a 37 °C até alcançar a turbidez de uma solução padrão McFarland de 0,08 – 0,1, resultando em uma concentração de 10⁸ UFC mL⁻¹. As leituras de turbidez foram realizadas utilizando espectrofotômetro (Shimadzu UV-160 1 PC) em 625 nm. A solução de inóculo obtida anteriormente foi diluída em TSB até 10⁷ UFC mL⁻¹.

Concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB)

A concentração mínima inibitória (CMI) foi avaliada por microdiluição em TSB enriquecido com 0,5% de Tween 80, segundo a NCCLS (2003) nas concentrações de 100; 50; 25; 12.5; 6.25; 3.12; 1.56; 0.78; 0.39; 0.19; 0.095; 0.049 $\mu\text{L mL}^{-1}$ para os óleos essenciais de *S. montana* e *C. flexuosus* e 400; 200; 100; 50; 25; 12.5; 6.25; 3.12 $\mu\text{L mL}^{-1}$ para o óleo essencial de *M. fragrans*. O meio de cultivo foi utilizado como controle negativo e cloranfenicol como controle positivo. Os tratamentos foram inoculados com 10 μL da suspensão bacteriana na concentração de 10^7 UFC mL^{-1} e incubados em BOD por 24 h a 37 °C. A CMI foi determinada como a menor concentração em que não se observou mudança visual de turbidez em relação ao controle negativo.

A avaliação da concentração mínima bactericida (CMB) foi realizada segundo NCCLS (2003). Duas concentrações acima e uma abaixo da concentração mínima inibitória foram utilizadas para determinação da CMB. O plaqueamento foi realizado pelo método de microgota em Agar Muller-Hinton, as placas foram divididas em quatro quadrantes nos quais foram adicionados 10 μL das suspensões contendo as concentrações em estudo, seguido de incubação por 24 horas em BOD a 37 °C. Após esse período, os quadrantes foram avaliados e a menor concentração que apresentou ausência total de crescimento microbiano na superfície do meio de cultivo foi definida como CMB. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV

A influência dos óleos essenciais de *S. montana*, *M. fragrans* e *C. flexuosus* na morfologia das bactérias foi avaliada por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) em um microscópio eletrônico de varredura (Leo EVO 040). Trinta microlitros da CMI de cada óleo essencial foram transferidos para microtubos de centrífuga, tipo eppendorfs, contendo 30 μL de solução fixadora Karnovsky modificado (Glutaraldeído 2,5%, formaldeído 2%, tampão cacodilato 0,05 M, pH 7.2 e CaCl_2 0.001 M) e incubados por um período mínimo de 24 horas. Posteriormente, o conteúdo dos eppendorfs foi lavado com tampão cacodilato pH 7,2, por 2 vezes de 10 minutos, desidratadas pela exposição sequencial a 25, 50, 75, 90 e 100% de acetona, secas em aparelho de ponto crítico (Bal-tec CPD 030) e pulverizadas com ouro (DE OLIVEIRA et al., 2017).

Atividade antioxidante dos óleos essenciais

Estabilização de radicais DPPH

A avaliação da atividade antioxidante pelo ensaio de DPPH foi realizada seguindo metodologia descrita por Teixeira et al. (2012). Em tubos de ensaio, foram incubados 2700 μL de solução etanólica de DPPH (40 mg L^{-1}) e 300 μL de óleos essenciais diluídos em etanol nas concentrações de 25 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, por 60 minutos ao abrigo de luz. Após esse período, foram realizadas leituras em espectrofotômetro UV/VIS (Shimadzu UV-160 1 PC) em 515 nm. O ensaio foi realizado em triplicata e o antioxidante BHT utilizado como controle positivo. A porcentagem de atividade antioxidante (% AA) foi mensurada pela Equação 1. E o IC_{50} determinado pela equação da curva de concentração *versus* % AA.

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

Em que: A_{amostra} é a absorbância da solução contendo todos os reagentes e A_{controle} é a absorbância do controle.

Branqueamento de β -caroteno

O ensaio de branqueamento de β -caroteno foi realizado segundo metodologia descrita por Kulisic et al. (2004), com modificações. Uma emulsão foi preparada em um balão de fundo redondo pela adição de 0,2 g de ácido linoleico, 1,0 g de Tween 20; 0,003 g de β -caroteno e 15 mL de clorofórmio, seguido de 1 hora de rota-evaporação a 50 °C para retirada do solvente. Em tubos de ensaio foram adicionados 2500 μL de emulsão e 100 μL de óleo essencial diluídos em etanol, nas concentrações de 25 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As medidas de absorbância em UV/Vis foram obtidas a 470 nm no tempo zero e, após 60 minutos, a 50 °C, protegido da luz. O antioxidante BHT foi utilizado como controle positivo e todas as análises foram realizadas em triplicata. A porcentagem de atividade antioxidante (% AA) foi obtida pela equação 2. E o IC_{50} , determinado pela equação da curva de concentração *versus* % AA.

$$\% \text{AA} = 100 \{1 - [(A_0 - A_t) / (A_{00} - A_{0t})]\} \quad \text{Equação 2}$$

Em que, A_0 e A_{00} representam as absorvâncias do controle e amostra no tempo zero, enquanto A_t e A_{0t} correspondem à absorbância do controle e amostra após 60 minutos de incubação.

Redução do ferro (poder redutor)

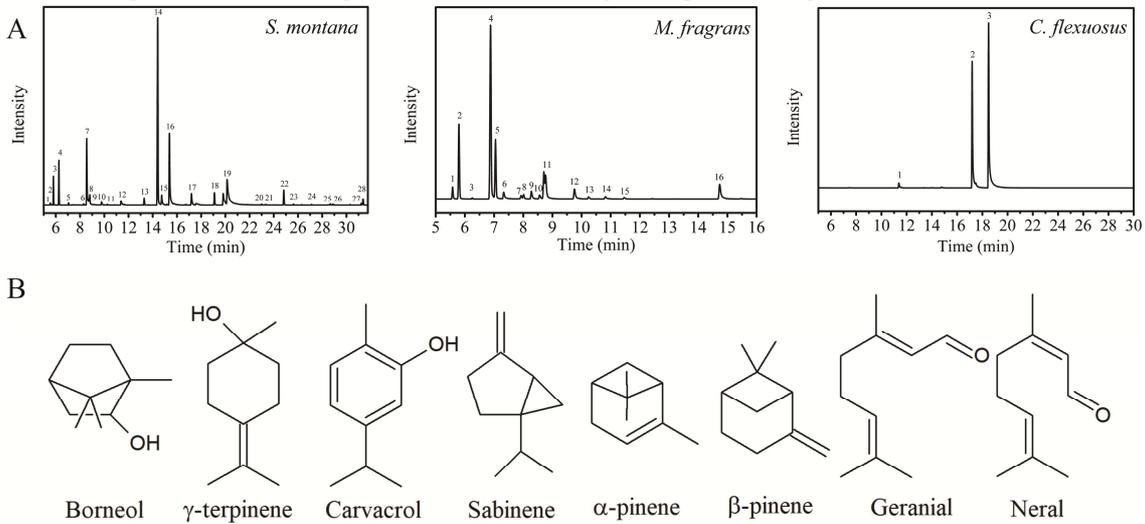
O ensaio para avaliação do poder redutor dos óleos essenciais foi realizado segundo Kanatt et al. (2007), com modificações. Foram adicionados a tubos de ensaio 50 μL dos óleos essenciais nas concentrações de 25 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 500 μL do tampão fosfato 200 mM, (pH 6), e 500 μL de hexacianoferrato III de potássio 1%. Em seguida, a mistura foi agitada e incubada a 50 °C por 20 minutos. Após esse procedimento, foram adicionados 1500 μL de água destilada, 500 μL de ácido tricloroacético 10% (TCA) e 300 μL de cloreto férrico (FeCl_3) 0,1%, seguida de leituras de absorbância em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1601PC) a 700 nm. Para a determinação da atividade antioxidante, foi construída uma curva da absorbância *versus* concentração. O padrão sintético utilizado para fins de comparação foi o ácido ascórbico.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Composição dos óleos essenciais

Os cromatogramas estão representados na Figura 1A, e os constituintes majoritários de cada óleo essencial na Figura 1B. O óleo essencial de *S. montana* L. apresentou principalmente borneol (36,18%), γ -terpineol (12,66%), carvacrol (11,07%) e p -cimeno (9,57%), ao passo que os majoritários no óleo essencial de *M. fragrans* foram sabineno (49,23%), α -pineno (13,81%) e β -pineno (10,75%). O composto citral, formado pelos isômeros geranial (59,66%) e neral (38,98%), foi identificado no óleo essencial de *C. flexuosus*.

Figura 4- Cromatogramas da identificação e quantificação dos óleos essenciais.



(A): *S. Montana*: 1- tricyclene, 2- α -thujene, 3- α -pinene, 4- camphene, 5- β -pinene, 6- α -terpinene, 7- p-cymene, 8- limonene, 9- eucalyptol, 10- γ -terpinene, 11- cis sabinene hydrate, 12- linalool, 13- camphor, 14- borneol, 15- terpinen-4-ol, 16- γ -terpineol, 17- NI, 18- isobornyl acetate, 19- carvacrol, 20- α -copaene, 21- β -bourbonene, 22- trans β -caryophyllene, 23- aromadendrene, 24- germacrene D, 25- γ -cadinene, 26- δ -cadinene, 27- spathulenol, 28- caryophyllene oxide; *M. fragrans*: 1- α -thujene, 2- α -pinene, 3- camphene, 4- sabinene, 5- β -pinene, 6- myrcene, 7- α -phellandrene, 8- δ -carene, 9- α -terpinene, 10- p-cymene, 11- limonene, 12- γ -terpinene, 13- cis sabinene hydrate, 14- terpinolene, 15- trans sabinene hydrate, 16- terpinen-4-ol; *C. flexuosus*: 1- linalool, 2- neral, 3- geranial. (B): Principais constituintes encontrados nos óleos essenciais de *S. montana*, *M. fragrans* e *C. flexuosus*.

A caracterização dos óleos essenciais de cada espécie está de acordo com os relatos encontrados na literatura (ADUKWU; ALLEN; PHILLIPS, 2012; SONI; SHARMA; JASUJA, 2016; SILVA et al., 2015; SUKCHAROEN; SIRIROTE; THANABORIPAT, 2019; VITANZA et al., 2019). A diferença nas composições e porcentagens dos compostos presentes nos óleos essenciais deve-se a fatores edafoclimáticos, local e horário de coleta, tipo de solo, nutrientes, época e região de coleta, entre outros, que podem causar interferência na produção de metabólitos secundários, que são respostas adaptativas das plantas ao ambiente no qual estão inseridas (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Atividade Antibacteriana – CMI e CMB

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais em estudo sobre bactérias patogênicas *E. coli* e *S. aureus* está apresentada em relação aos valores de CMI e CMB na Tabela 1. Os resultados mostram que o óleo essencial de *S. montana* apresentou concentração mínima inibitória e bactericida iguais para ambas as bactérias avaliadas, ao passo que os valores de CMI e CMB diferiram em relação aos óleos essenciais de *M. fragrans* e *C. flexuosus* frente a

cepas de *S. aureus*. O óleo essencial de *S. montana* foi mais eficaz em inibir o crescimento de cepas de *E. coli*. Já o óleo essencial de *C. flexuosus* foi mais efetivo contra cepas bacterianas de *S. aureus*. O óleo essencial de *M. fragrans* apresentou baixa atividade sobre as bactérias avaliadas, apresentando os maiores valores de CMI e CMB. Os resultados encontrados estão de acordo com aqueles relatados na literatura, com algumas divergências que são na maioria das vezes devido à variabilidade na composição química dos óleos essenciais (AZEVEDO et al., 2016; LIMA et al., 2012; SANTOS et al., 2019). O fato de os óleos essenciais apresentarem diferentes compostos atuando consecutivamente como antimicrobiano dificulta o crescimento bacteriano e o desenvolvimento de cepas resistentes, provavelmente, pelo efeito de sensibilidade colateral, em que a adaptação do microrganismo a uma droga, o torna mais sensível a outra (YEN; PAPIN, 2017). Esse provavelmente é o efeito que determinou a ação dos óleos avaliados, uma vez que possuem diferentes princípios ativos que atuam com certo grau de toxicidade em microrganismos.

Tabela 1 – Concentração mínima inibitória e mínima bactericida dos óleos essenciais frente à *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Plantas	CMI ($\mu\text{L mL}^{-1}$)		CMB ($\mu\text{L mL}^{-1}$)	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
<i>Satureja montana</i> L.	6,25	50	6,25	50
<i>Myristica fragrans</i> H.	200	200	200	400
<i>Cymbopogon flexuosus</i>	12,5	6,25	12,5	12,5

Um dos componentes majoritários do óleo essencial de *S. montana* é o terpeno aromático, carvacrol. De acordo com Saad et al. (2013), o carvacrol promove trocas iônicas por meio de membranas biológicas, o que resulta em um desequilíbrio de íons K^+ levando à morte celular. A presença desse constituinte explica a maior habilidade do óleo essencial dessa espécie frente a cepas bacterianas como *E. coli*, que apesar de ser Gram-negativa, e apresentar uma membrana adicional de fosfolipídios e lipopolisacarídeos, foi susceptível à ação do óleo essencial rico em carvacrol, em baixa concentração. O óleo essencial de *C. flexuosus*, por sua vez, apresenta o terpeno citral como majoritário. Esse componente químico é relatado por Desai e Parikh (2012) como um potente inibidor do crescimento de microrganismos patogênicos em plantas, animais e humanos. Esses dados corroboram com os resultados obtidos neste trabalho, no qual foi observado que o óleo essencial de *C. flexuosus* apresentou um potencial promissor para eliminação tanto de *E. coli* como de *S. aureus*, obtendo uma CMB de $12,5 \mu\text{L mL}^{-1}$ para ambas. Patterson e colaboradores (2017),

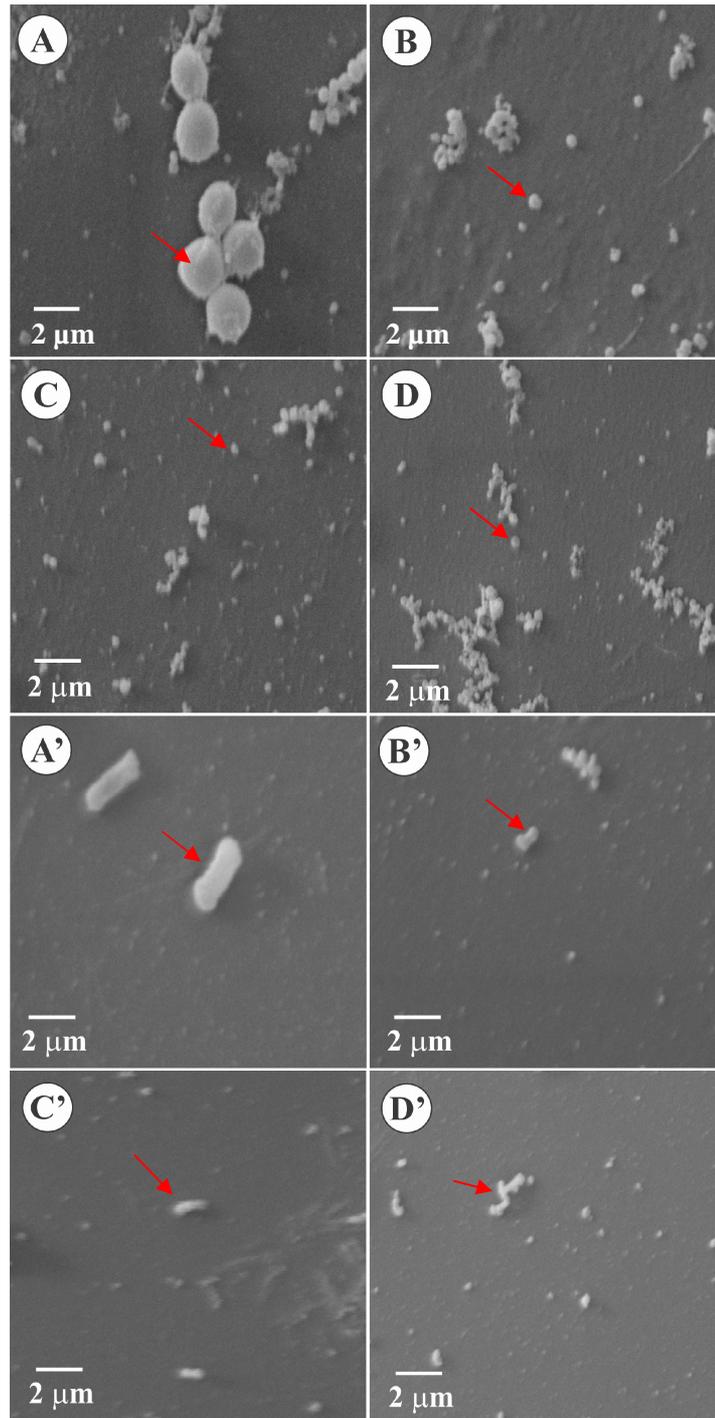
avaliando a eficiência de vários óleos essenciais contra cepas Gram-positivas e Gram-negativas, também verificaram que o óleo essencial de *C. flexuosus* apresentou potencial contra ambas às cepas, com uma maior eficiência contra organismos Gram-positivos.

Apesar de ter apresentado CMI e CMB mais elevados, o óleo essencial de *M. fragrans* também demonstrou potencial como antimicrobiano. Os terpenos presentes nesse óleo essencial já foram relatados como tóxicos a células bacterianas (CAMARGO et al., 2019).

Efeitos provocados pelos óleos essenciais nas bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

As eletromicrografias do grupo controle para ambas as bactérias são mostradas na Figura 2, na qual se observa uma estrutura típica de bacilos e cocos para *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente. Os efeitos deletérios dos óleos essenciais na morfologia de ambas as espécies puderam ser observados em todos os tratamentos, embora não haja evidências de ruptura na membrana celular, apenas de redução no tamanho e formato dos bacilos e cocos.

Figura 2 - Eletromicrografias de varredura de *S. aureus* e *E. coli*; A, B, C e D são eletromicrografias de *S. aureus* sem tratamento e tratados com óleos essenciais de *S. montana*, *M. fragrans* e *C. flexuosus*, respectivamente; A', B', C' e D' são eletromicrografias de *E. Coli* sem tratamento e tratados com óleos essenciais de *S. montana*, *M. fragrans* e *C. flexuosus*, respectivamente.



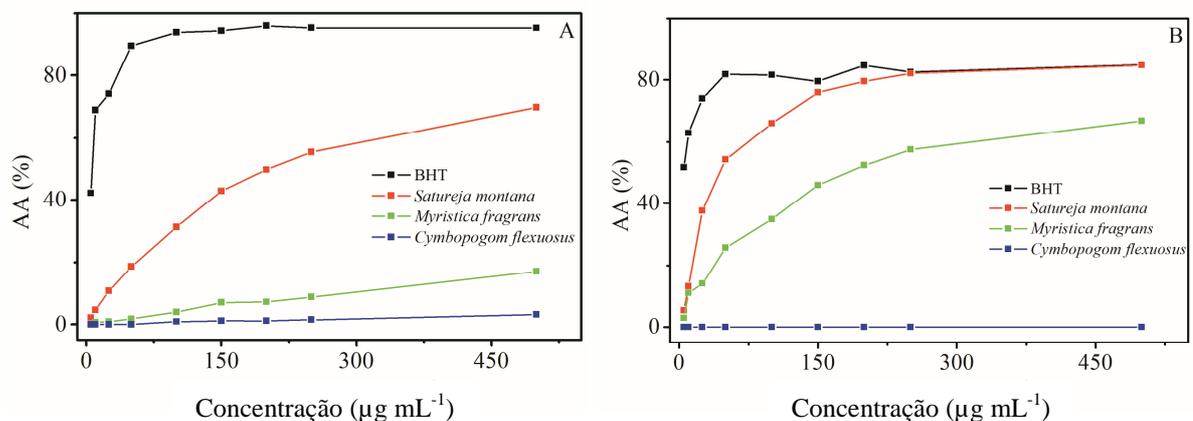
A partir dos dados de microscopia eletrônica de varredura, verifica-se que os óleos essenciais de *S. montana*, *M. fragrans* e *C. flexuosus* interferiram significativamente no crescimento de *S. aureus* e *E. Coli*. Os constituintes químicos encontrados nos óleos essenciais podem ter causado danos à parede celular desses microrganismos (CAMARGO et al., 2019).

De acordo com Nazarro et al. (2013), a exposição de bactérias ao carvacrol presente no óleo essencial de *S. montana* L. produz modificações morfológicas, como alterações na estrutura da superfície celular, liberação de lipopolissacarídeos, além de alterar o transporte de íons através da membrana citoplasmática. Assim, pode ocorrer uma perturbação na integridade da membrana, aumentando a permeabilidade e causando um vazamento de íons e a morte celular. Além disso, García-Salinas et al. (2018) sugeriram que a presença do grupo hidroxila altera e compromete o metabolismo energético que influencia a expressão gênica. Os grupos de hidroxilas alcoólicas também estão presentes na composição dos óleos essenciais de *M. fragrans* H. e *C. flexuosus*, podendo ter contribuído para que os resultados morfológicos obtidos para os três óleos essenciais sejam semelhantes.

Potencial antioxidante dos óleos essenciais

Os resultados das atividades antioxidantes (Figura 3) mostraram a atividade dose dependente e o comportamento exponencial.

Figura 3 - Comportamento do antioxidante BHT e dos óleos essenciais de *S. montana*, *M. fragrans* e *C. flexuosus* na estabilização de radicais DPPH (A) e no ensaio de branqueamento de β -caroteno (B).



A partir das equações obtidas das curvas de porcentagem de atividade antioxidante (%AA) versus concentração, foi possível determinar o IC₅₀, como a concentração capaz de estabilizar e proteger 50% dos radicais livres e substratos lipídicos nos ensaios de DPPH e branqueamento de β-caroteno, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2 - Valores de IC₅₀ para o método de sequestro de radicais DPPH• e branqueamento do β-caroteno.

Amostras	Ic ₅₀ (µg mL ⁻¹)	
	DPPH	β-caroteno
BHT	5,81 a	2,30 a
<i>Satureja montana</i> L.	200,72 b	45,50 b
<i>Myristica fragrans</i> H.	> 500 c	177,63 c
<i>Cymbopogon flexuosus</i>	> 500 c	-

- Não exibiram atividade antioxidante. As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas não diferem entre si pelo Teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

O controle BHT exibiu maior atividade antioxidante seguido do óleo essencial de *S. montana* e *M. fragrans*. As amostras e o controle foram mais responsivos ao ensaio de branqueamento de β-caroteno, apresentando melhores resultados e menores valores de IC₅₀. Os óleos essenciais de *M. fragrans* e *C. flexuosus* apresentaram baixa atividade e nenhum resultado conciso foi obtido no ensaio de β-caroteno para o óleo essencial de *C. flexuosus*.

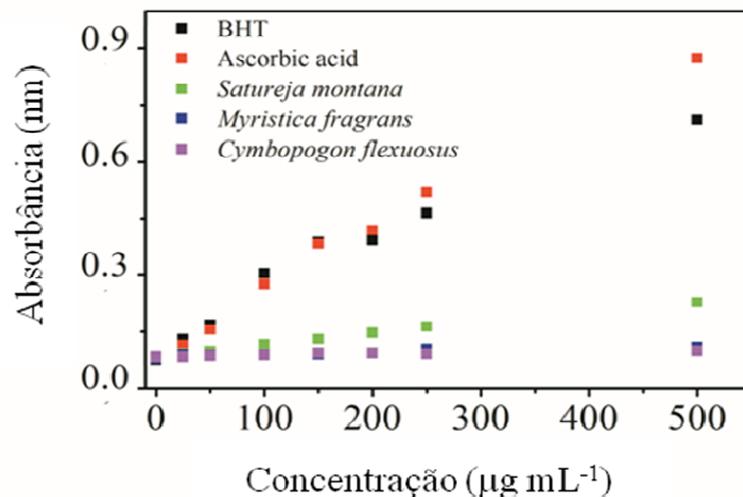
O maior potencial antioxidante do óleo essencial de *S. montana* pode ser devido ao carvacrol, seu componente majoritário. Este, por ser um composto fenólico, é eficiente na estabilização de radicais livres e atua também na proteção de outras biomoléculas contra oxidação, agindo como antioxidante direto preventivo e de quebra de cadeia, que inibe e interrompe a propagação de reações de peroxidação lipídica (AMORATI; FOTI; VALGIMIGLI, 2013; FERREIRA et al., 2019). Elgndi et al. (2017), avaliando a atividade antioxidante do óleo essencial de *S. montana*, relataram um IC₅₀ de 5,05 µg mL⁻¹, resultado que foi atribuído aos altos teores de carvacrol no óleo essencial dessa espécie.

Os óleos essenciais de *M. fragrans* e *C. flexuosus* não apresentam compostos fenólicos em sua composição química. Possivelmente, essa foi a principal razão para a baixa atividade antioxidante, uma vez que bons antioxidantes devem ser capazes de doar átomos de hidrogênio ou elétrons e se estabilizarem por efeitos de hiperconjugativos e estruturas de ressonância (FERREIRA et al., 2019). Hidrocarbonetos e álcoois terpênicos podem atuar como antioxidantes indiretos, que apesar de não exibem comportamento antioxidante

relevante, aumentam as defesas antioxidantes em sistemas vivos, induzindo a expressão ou aumentando a atividade de enzimas antioxidantes, como fazem os cofatores e alguns íons metálicos (AMORATI; FOTI; VALGIMIGLI, 2013). Os resultados encontrados para os óleos essenciais de *M. fragrans* e *C. flexuosus* estão de acordo com os relatos encontrados na literatura para essas espécies, bem como para seus componentes majoritários (LIMA et al., 2012; REZENDE et al., 2017).

A atividade antioxidante dos óleos essenciais também foi avaliada quanto à habilidade desses compostos em reduzir íons metálicos, como o complexo ferricianeto a ferrocianeto. Na Figura 4, observa-se o efeito da concentração das amostras e dos controles na variação de absorbância na região de formação do azul da Prússia (700 nm). Pode-se observar que os óleos essenciais e controles exibiram comportamento linear e dose dependente.

Figura 4 – Poder redutor, efeito da concentração na variação da absorbância no comprimento de onda 700 nm.



De acordo com os resultados, o aumento na absorbância indica potencial das amostras em reduzir íons Fe^{+3} a Fe^{+2} . Consequentemente, a inclinação da curva absorbância *versus* concentração pode ser utilizada para avaliar o poder antioxidante das amostras. Entre as amostras avaliadas, o ácido ascórbico apresentou a maior inclinação ($1,6 \times 10^{-3}$), exibindo melhor resposta antioxidante, seguido pelo BHT ($1,3 \times 10^{-3}$), e pelos óleos essenciais de *S. montana* ($2,9 \times 10^{-4}$), *M. fragrans* ($6,4 \times 10^{-5}$) e *C. flexuosus* ($3,7 \times 10^{-5}$), sendo os dois últimos iguais. Comparado aos antioxidantes BHT e ácido ascórbico, os óleos essenciais de *M.*

fragrans e *C. flexuosus* não possuem potencial para reduzir íons ferro em solução. Já o óleo essencial de *S. montana* apresentou baixa atividade no ensaio em questão. Os resultados são consistentes com os encontrados nos ensaios de DPPH e branqueamento de β -caroteno, uma vez que apenas o óleo essencial de *S. montana* foi melhor como antioxidante e os demais apresentaram altos valores de IC₅₀. O ensaio de Poder redutor avalia a habilidade de oxidação das moléculas em estudo, que por meio da doação de elétrons, podem reduzir íons ferro (III). De acordo com Ferreira et al. (2019), compostos fenólicos são mais susceptíveis a sofrerem oxidação por resultar em um intermediário estabilizado por ressonância. Logo, os resultados obtidos no ensaio de poder redutor são diretamente dependentes da estrutura química das amostras.

4 - CONCLUSÃO

Foram encontrados principalmente terpenos hidrocarbonos e oxigenados nos óleos essenciais de *Satureja montana* L., *Myristica fragrans* H. e *Cymbopogon flexuosus*, com exceção do óleo essencial de *S. montana* no qual se observou a presença do monoterpene aromático, carvacrol.

As cepas de *Escherichia coli* foram mais sensíveis à ação do óleo essencial de *Satureja montana* L., ao passo que *Staphylococcus aureus* foi mais vulnerável ao óleo essencial de *Cymbopogon flexuosus*. O óleo essencial de *M. fragrans* apresentou baixa atividade bacteriana, exibindo valores mais altos de CMI e CMB. Todos os óleos essenciais causaram danos à parede celular de *E. coli* e *S. aureus*.

Os óleos essenciais apresentaram moderada a baixa atividade antioxidante em todos os ensaios, resultados que são consistentes com os obtidos na caracterização química. Mas apesar disso, podem ser potentes aliados no controle do estresse oxidativo in vivo, devido a seus altos teores de terpenos e terpenoides, antioxidantes indiretos.

AGRADECIMENTOS

Ao apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) na forma da Bolsa de Produtividade e recursos financeiros; à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), e à Fundação de Amparo em Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig) pelo apoio financeiro.

5 - REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4. ed. Carol Stream: Allure, 2017; 804 p.
- ADUKWU, E. C.; ALLEN, S. C.; PHILLIPS, C. A The anti-biofilm activity of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) essential oils against five strains of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**; v. 113, n. 5, p. 1217-1227, 2012.
- AMORATI, R.; FOTI, M. C.; VALGIMIGLI, L. Antioxidant activity of essential oils. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, n. 46, p. 10835-10847, 2013.
- AZEVEDO, I. L. et al. Eficácia *in vitro* do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon flexuosus* steud. wats.) frente a bactérias entéricas de origem avícola. **Acta Veterinária Brasília**; n. 10, n. 1, p. 25-31, 2016.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils. **Food and Chemical Toxicology**; v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BORAH, A et al. Chemical composition, antioxidant, anti-inflammatory, anti-microbial and in-vitro cytotoxic efficacy of essential oil of *Curcuma caesia* Roxb. leaves: An endangered medicinal plant of North East India. **Industrial Crops & Products**, v. 129, p. 448-454, 2019.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopéia brasileira**. 5. ed. Brasília, 2010; p. 198-199.
- CAI, X. T. et al. A natural biopreservative: Antibacterial action and mechanisms of Chinese *Litsea mollis* Hemsl. extract against *Escherichia coli* DH5 α and *Salmonella* spp. **Journal of dairy science**, v. 102, n. 11, p. 9663-9673, 2019.
- 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**, p. 1-8, 2019.
- CANIÇA, M. et al. Antibiotic resistance in foodborne bacteria. **Trends in Food Science & Technology**, v. 84, p. 41-44, 2019.
- 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.
- DESAI, M. A.; PARIKH, J. Hydrotropic extraction of citral from *Cymbopogon flexuosus* (Steud.) wats. **Industrial Engineering Chemistry Research**, v. 51, n. 9, p. 3750-3757, 2012.
- ELGNDI, M. A. et al. Antioxidative and cytotoxic activity of essential oils and extracts of *Satureja montana* L., *Coriandrum sativum* L. and *Ocimum basilicum* L. obtained by supercritical fluid extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 128, p. 128-137, 2017.

- 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.
- 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, p. 1399, 2018.
- GAYTÁN, M. O. et al. Type three secretion system in attaching and effacing pathogens. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 6, p. 1-25, 2016.
- 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.
- KANATT, S. R. et al. Antioxidant potential of mint (*Mentha spicata* L.) in radiation-processed lamb meat. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 451-458, 2007.
- KOTLOFF, K. L. et al. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. **Lancet**, v. 382, p. 209-222, 2013.
- KULISIC, T. et al. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. **Food Chemistry**, v. 85, p. 633-640, 2004.
- LIMA, R. K. et al. Bactericidal and Antioxidant Activity of Essential Oils from *Myristica fragrans* Houtt and *Salvia microphylla*. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 89, n. 3, p. 523-528, 2012.
- MANDAL, S. M. et al. Dissemination of antibiotic resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *S. aureus* strains isolated from hospital effluents. **American journal of infection control**, v. 43, n. 12, p. e87-e88, 2015.
- MARTELLI, G; GIACOMINI, D. Antibacterial and antioxidant activities for natural and synthetic dual-active compounds. **European journal of medicinal chemistry**, v. 158, p. 91-105, 2018.
- NATIONAL COMMITTEE. FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**: approved standard. 6. ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2003.
- NAZZARO, F. et al. Effect of essential oils on pathogenic bacteria, **Pharmaceuticals**, v. 6, p. 1451-1474, 2013.
- OLSZOWY, M. What is responsible for antioxidant properties of polyphenolic compounds from plants?. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 24, 2019.

- PATTERSON, J. E. et al. In vitro susceptibility testing of essential oils against Gram-positive and Gram-negative clinical isolates, including Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae (CRE). **Open Forum Infectious Diseases**, v. 4, n. 1, p. 370-370, 2017.
- PARJIT, K.; PETERSON, E. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2928, 2018.
- REZENDE, D. A, C. S. et al. Characterization of the Biological Potential of the Essential Oils from Five Species of Medicinal Plants. **American Journal of Plant Sciences**, v. 08, p.154-170, 2017.
- SAAD, N. Y. et al. Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 28, n. 5, p. 269-279, 2013.
- SANDOVAL-MOTTA, S.; ALDANA, M. Adaptive resistance to antibiotics in bacteria: a systems biology perspective. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**, v. 8, n. 3, p. 253-267, 2016.
- SANTOS, J. D. C. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of *Satureja Montana* by products essential oils. **Industrial Crops & Products**, v. 137, p. 541-548, 2019.
- SIDDIQUE, S.; et al. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of essential oils from leaves of three *Melaleuca* species of *Pakistani flora*. **Arabian Journal of Chemistry**, 2017.
- SILVA, L. F. et al. Óleo essencial de *Satureja montana* L.: análise cromatográfica, determinação das atividades antioxidante e antifúngica. **E-xacta**, v. 8, n. 2, p. 55-63, 2015.
- SINGH, R. et al. Antibiotic resistance in major rivers in the world: A systematic review on occurrence, emergence, and management strategies. **Journal of Cleaner Production**, 2019.
- SONI, R.; SHARMA, G.; JASUJA, N. D. Essential Oil Yield Pattern and Antibacterial and Insecticidal Activities of *Trachyspermum ammi* and *Myristica fragrans*. **Hindawi Publishing Corporation Scientifica**, 2016.
- SUKCHAROEN, O. et al. Control of aflatoxigenic strains by *Cinnamomum porrectum* essential oil. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 9, p. 2929-2935, 2017.
- TAYLOR, T. A; UNAKAL, C. G. **Staphylococcus Aureus**. NCBI Bookshelf. A service of the National Library of Medicine, National Institutes of Health, 2018.
- THARMALINGAM, S. et al. Reactive nitrogen species (RNS)-resistant microbes: adaptation and medical implications. **Biological Chemistr**, v. 398, p. 1193-1208, 2017.
- TEIXEIRA, M. et al. *Citrumelo Swingle*: Caracterização Química, Atividade Antioxidante e Antifúngica dos Óleos Essenciais das Cascas Frescas e Secas. **Magistra**, v. 24, n. 3, p. 194-203, 2012.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **J Chromatogr A**, v. 11, p. 463-471. 1963.

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.

YEN, P.; PAPIN, J. A. History of antibiotic adaptation influences microbial evolutionary dynamics during subsequent treatment. **PLoS biology**, v. 15, n. 8, p. e2001586, 2017.

ZHAO, X.; DRLICA, K. Reactive oxygen species and the bacterial response to lethal stress. **Curr Opin Microbiol**, v. 21, p. 1-6, 2014.

ARTIGO 3 - EFEITO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Satureja montana* L., *Myristica fragrans* H. E *Cymbopogon flexuosus* SOBRE *Aspergillus flavus* e *Aspergillus ochraceus* PRODUTORES DE MICOTOXINAS

RESUMO

Os óleos essenciais podem ser uma alternativa útil ao uso de fungicidas sintéticos, por apresentarem potencial biológico e relativa segurança para os alimentos e produtos agrícolas. Os objetivos do trabalho foram avaliar a atividade antifúngica e antimicotoxigênica dos óleos essenciais de *Satureja montana* L., *Myristica fragrans* H. e *Cymbopogon flexuosus* sobre *Aspergillus flavus* e *Aspergillus ochraceus*, bem como a influência na síntese de ergosterol e na morfologia das membranas. O potencial antifúngico foi avaliado por meio da análise de crescimento micelial e microscopia eletrônica (MEV). Os óleos essenciais de *S. montana*, *M. fragrans* e *C. flexuosus* apresentaram efeito fungicida contra *A. flavus* (0,98; 15,62 e 0,98 $\mu\text{L mL}^{-1}$) e *A. ochraceus* (3,91; 15,62 e 0,98 $\mu\text{L mL}^{-1}$), respectivamente. Os óleos essenciais inibiram significativamente a produção de ocratoxina A produzida pelo fungo *A. ochraceus*. Essa inibição variou de 34,35 a 100%, 31,24 a 93,72% e 24,52 a 100% nos tratamentos com *S. montana*, *M. fragrans* e *C. flexuosus*, respectivamente. Inibiram também a produção de aflatoxinas B₁ e B₂. A biossíntese de ergosterol foi inibida com os tratamentos aplicados. A atividade biológica na membrana celular fúngica foi observada com a presença dos óleos essenciais, pois foram detectados nas eletromicrografias efeitos deletérios nas morfologias dos fungos. Os óleos essenciais em estudo são promissores como conservantes de alimentos, pois inibiram significativamente fungos toxigênicos que contaminam alimentos. Além disso, dificultaram a biossíntese de micotoxinas.

Palavras-chave: micotoxinas, potencial biológico, aflatoxina, ocratoxina, ergosterol.

1 - INTRODUÇÃO

Os fungos do gênero *Aspergillus* são comumente encontrados em produtos alimentícios e são conhecidos como fungos filamentosos e caracterizados por colônias brilhantes e coloridas, geralmente verdes, amarelas, castanhas, marrons ou pretas. Alguns fungos pertencentes ao gênero são denominados toxigênicos, como *A. ochraceus*, *A. flavus* entre outros, que contaminam e produzem micotoxinas em culturas de café, uva, cereais e produtos com alto teor de amido (SALDAN et al., 2018, ZHANG et al., 2017). A contaminação pode ocorrer em diferentes alimentos ou rações, pelo contato com esporos presentes no ambiente e no solo, durante a colheita, armazenamento e transporte; e representam uma ameaça à saúde humana e animal devido à toxicidade desses metabólitos (GU; WANG; WANG, 2019; SALDAN et al., 2018). Entre as micotoxinas de preocupação mundial, destacam-se a ocratoxina A e as aflatoxinas B₁ e B₂, que são classificadas pela Agência Internacional de Pesquisa do Câncer como substâncias carcinogênicas, teratogênicas, mutagênicas, hepatóxicas, nefrotóxicas e imunossupressoras para humanos e animais (IARC, 1993; IARC, 2012). Além da preocupação com a saúde do consumidor, a ação deletéria dos fungos do gênero *Aspergillus* tem grande impacto econômico no agronegócio e nas indústrias de alimentos, uma vez que tais fungos desempenham grande importância ecológica como agentes de decomposição da matéria orgânica, causando, assim, expressivas modificações sensoriais e perdas nutricionais nos alimentos por eles contaminados (GU; WANG; WANG, 2019; SALDAN et al., 2018).

Uma das formas eficazes no controle da contaminação fúngica é a utilização de fungicidas sintéticos, que impedem o desenvolvimento dos fungos toxigênicos e/ou a produção de micotoxinas em alimentos e rações (OLIVEIRA et al., 2020). Entretanto, o uso indiscriminado desses produtos tem contribuído para a seleção de microrganismos menos susceptíveis ou resistentes, além da preocupação pública com o bem-estar dos consumidores e com os resíduos químicos, muitas vezes tóxicos a organismos vivos e ao ambiente (HU et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2020, TOYOTOME et al., 2020). Assim, existe uma demanda pública por métodos alternativos de controle, principalmente de espécies toxigênicas, como *A. ochraceus* e *A. flavus*, que são atóxicos ao organismo, ambientalmente saudáveis, que dificultem a seleção de patógenos resistentes e que possuam propriedades biodegradáveis (HU et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2020). Esse novo campo de estudo abrange a busca por produtos de origem natural, como os óleos essenciais, que por anos vêm sendo reconhecidos

como conservantes em geral, exibindo alto potencial fungicida (JAHANI; PIRA; AMINIFARD, 2020; KALEMBA; KUNICKA, 2003). Sua composição química rica e variada dificulta a seleção de patógenos resistentes e, por serem produtos de origem natural, são biodegradáveis, além de exibirem relativa segurança alimentar, pois a maioria dos óleos essenciais são classificados como GRAS, “Geralmente Reconhecido como Seguro”, pela Food and Drugs Administration (FDA).

Diversos trabalhos relatam o potencial fungicida dos óleos essenciais. Hu et al. (2017) avaliaram o mecanismo envolvido nas propriedades antifúngica e antiaflatoxigênica do óleo essencial derivado de açafrão (*Curcuma longa* L.) em *A. flavus*. Os autores observaram atividade *in vitro* e *in vivo*, perturbação da membrana plasmática fúngica e das funções mitocondriais e regulação da expressão do gene da aflatoxina. Abdel-Aziz; Emam; Elsherbiny (2019), pesquisando o óleo essencial de casca de tangerina, relataram que ele atua como antibiofilme natural contra *A. niger* em bulbos de cebola. Recentemente, Oliveira et al. (2020), estudando o óleo essencial de tomilho, observaram que ele pode suprimir o crescimento e a produção de aflatoxina B₁ por *A. flavus*. Jahani; Pira; Aminifard (2020) acreditam que os óleos essenciais podem ser uma alternativa útil ao uso de fungicidas sintéticos.

Dessa forma, os objetivos do presente trabalho foram avaliar o potencial fungicida dos óleos essenciais de *Satureja montana* L., *Myristica fragrans* H., *Cymbopogon flexuosus* sobre fungos *A. ochraceus* e *A. flavus*, bem como o potencial antiocrotaxigênico e antiaflatoxigênico, respectivamente, e a influência dos óleos essenciais na síntese de ergosterol e na morfologia das membranas celulares de ambos os fungos.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção dos microrganismos e preparo da solução de esporos

Foram estudadas duas espécies de fungos filamentosos: *Aspergillus ochraceus* (CCDCA 10506) e *Aspergillus flavus* (CCDCA 10508). As espécies utilizadas foram adquiridas da Coleção de Cultura de Microrganismos do WDCM 1081 Departamento de Ciência dos Alimentos da UFLA. Os fungos foram incubados em placas de Petri contendo o meio de cultura Malt Extract Agar (MEA, HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, Índia) por

um período de 7 dias a 25 °C em uma incubadora BOD. Após 7 dias, foi preparada uma suspensão de esporos com solução de água destilada contendo Tween 80 (1%) (Synth, Diadema, SP, Brazil). Foi utilizada uma câmara de Neubauer para determinar a concentração de esporos (10^6 esporos mL^{-1}).

Avaliação dos óleos essenciais sobre o crescimento micelial

O crescimento micelial dos fungos foi avaliado de acordo com Singh et al. (2008) com modificações. O plaqueamento foi realizado com 10 μL da suspensão de esporos (10^6 esporos mL^{-1}) no centro da placa contendo 20 mL de meio Yeast Extract Sucrose Agar (YES). Os óleos essenciais foram diluídos em dimetilsulfóxido puro (DMSO) e misturados no meio de cultura. As concentrações testadas foram 0,015; 0,061; 0,24; 0,98; 3,91 e 15,62 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Como padrão de comparação, 10 μL da suspensão de esporos foram adicionados à placa contendo apenas o meio de cultura (controle fúngico). Todas as placas foram incubadas em estufa BOD a 25 °C, por 10 dias. Foram realizadas as medições nos dois lados do diâmetro do crescimento micelial no último dia de incubação. Essas análises foram realizadas em triplicata. O cálculo da porcentagem de inibição do crescimento micelial foi realizado de acordo com a seguinte equação: $I = [(dc-dt) / dc] \times 100$, em que dc (cm) é o diâmetro do crescimento micelial do controle fúngico e dt (cm) é o diâmetro do crescimento micelial de cada tratamento com o óleo essencial. A concentração mínima fungicida (CMF) foi considerada a menor concentração de óleo essencial que inibiu completamente o crescimento de fungos.

Avaliação dos óleos essenciais na síntese de Ocratoxina A

A atividade antimicotoxigênica foi preparada a partir do ensaio de crescimento micelial. A inibição de ocratoxina A (OTA) pelos óleos essenciais de *S. montana* (0,015; 0,061; 0,24; 0,98 $\mu\text{L mL}^{-1}$), *M. fragrans* (0,015; 0,061; 0,24; 0,98; 3,91 $\mu\text{L mL}^{-1}$) e *C. flexuosus* (0,015; 0,061; 0,24 $\mu\text{L mL}^{-1}$) em *A. ochraceus* foi testada em concentrações abaixo do CMF. A extração de OTA foi realizada no 10º dia de incubação de acordo com Passamani et al. (2014). Foram removidos três plugs da colônia, no centro, meio e borda. Os “plugs” foram pesados e colocados em tubos de ensaio. Foi adicionado 1 mL de metanol (Merck,

Darmstadt, Alemanha, grau PA) em cada tubo de ensaio, que foram agitados vigorosamente por 5 segundos e mantidos à temperatura ambiente por 60 minutos. Os extratos foram filtrados por unidades filtrantes de PTFE (politetrafluoretileno) (0,22 µm; Millipore).

A quantificação da OTA foi determinada pelo método de Passamani et al (2014), em que 20 µL do extrato filtrado foi injetado diretamente no cromatográfico líquido de alta eficiência (Shimadzu, modelo SPD-M20A, Kyoto, Japão), equipado com duas bombas de alta pressão, um degaseificador (DGU 20A3), interface (CBM-20A), injetor automático (SIL-10AF) e detector de fluorescência (RF-10 AXL). A separação do constituinte foi realizada usando uma coluna Agilent-Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 250 mm, 5 µm) conectada a uma pré-coluna Agilent-Zorbax Eclipse XDB-C18 4-Pack (4,6 x 12, 5 mm, 5 µm). A eluição foi realizada em sistema isocrático de 35:35:29:1 (metanol: acetonitrila: água: ácido acético). O comprimento de onda utilizado: excitação a 332 nm e emissão de 476 nm. O fluxo utilizado foi de 0,8 mL min⁻¹. O tempo médio de retenção da OTA foi de 11 ± 0,1 min. A quantificação de OTA nas amostras foi realizada por meio de padronização externa, com a construção de uma curva analítica obtida por regressão linear correlacionando a área do pico e a concentração do padrão. O coeficiente de determinação (R²) foi de 0,9999, Limite de detecção (LOD) e Limite de quantificação (LOQ) foram de 0,0004 e 0,0016 µg g⁻¹, respectivamente. Todas as amostras e soluções padrão de OTA foram analisadas em triplicata. Para calcular a inibição (%) da produção de OTA pelos óleos essenciais, foi utilizada a seguinte equação: $I = [(Oc - Ot) / Oc] \times 100$, em que Oc é a ocratoxina produzida pelo controle e Ot é a ocratoxina produzida após tratamento com óleo essencial.

Avaliação dos óleos essenciais na síntese de Aflatoxinas B₁ e B₂

A atividade antimicotoxigênica foi preparada a partir do ensaio de crescimento micelial. A inibição da aflatoxina B₁ (AFB₁) e aflatoxina B₂ (AFB₂) pelos óleos essenciais de *S. montana* (0,015; 0,061; 0,24 µL mL⁻¹), *M. fragrans* (0,015; 0,061; 0,24; 0,98; 3,91 µL mL⁻¹) e *C. flexuosus* (0,015; 0,061; 0,24 µL mL⁻¹) em *A. flavus* foi testada em concentrações abaixo do CMF.

A identificação qualitativa de AFB₁ e AFB₂ foi determinada de acordo com o método de Freire et al. (2017), utilizando a Cromatografia em Camada Delgada (CCD). Foram utilizadas soluções padrão de aflatoxinas B₁ e B₂ (Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brasil), fase

estacionária (placa cromatográfica em camada fina de alumínio revestida com sílica gel) (Merck - Silica gel 60; 20×20 cm) e uma mistura de solventes composta por tolueno: acetato de etila: ácido fórmico (60:30:10) como fase móvel. A produção das micotoxinas foi confirmada sob a luz UV a 366 nm em um cromatovisor (CAMAG, Uf-206 Betrachter).

Atividade dos óleos essenciais na síntese de ergosterol

A análise de ergosterol foi realizada utilizando-se o meio líquido YES em Erlenmeyer para o cultivo da biomassa fúngica de *A. flavus* e *A. ochraceus*. O óleo essencial foi diluído em DMSO e adicionados ao meio de cultura. As concentrações testadas foram inferiores ao CMF pelos óleos essenciais de *S. montana* (0,015; 0,061; 0,24; 0,98 $\mu\text{L mL}^{-1}$), *M. fragrans* (0,015; 0,061; 0,24; 0,98; 3,91 $\mu\text{L mL}^{-1}$) e *C. flexuosus* (0,015; 0,061; 0,24 $\mu\text{L mL}^{-1}$) em *A. ochraceus*. E para *A. flavus*, as concentrações testadas foram, *S. montana* (0,015; 0,061; 0,24 $\mu\text{L mL}^{-1}$), *M. fragrans* (0,015; 0,061; 0,24; 0,98; 3,91 $\mu\text{L mL}^{-1}$) e *C. flexuosus* (0,015; 0,061; 0,24 $\mu\text{L mL}^{-1}$). Foram inoculados 10 μL de suspensão de esporos (10^6 esporos mL^{-1}) nos frascos de Erlenmeyer e incubados em BOD a 25 °C por 10 dias. Após a incubação, os micélios foram filtrados por um papel de filtro, pesado e utilizado para extração e quantificação do ergosterol.

A extração do ergosterol foi realizada de acordo com o método de Silva, Corso e Matheus (2010). Os micélios foram transferidos para tubos Falcon e adicionaram-se 20 mL de metanol (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), 5 mL de etanol (Merck, Darmstadt, Alemanha) e 2,0 g de hidróxido de potássio (Merck, Darmstadt, Alemanha). Os tubos fechados foram agitados em um agitador magnético (Nova Técnica, Piracicaba, SP, Brasil) durante 5 minutos e, em seguida, submetidos a um banho-maria (Nova Técnica, Piracicaba, SP, Brasil) a 70 °C por 40 minutos. Após chegar à temperatura ambiente, foram adicionados aos tubos 5 mL de água destilada e centrifugados a 965,36 x g por 30 minutos (Fanem Baby I Modelo 206 BL, São Paulo, Brasil). Os sobrenadantes foram removidos e adicionaram-se 15 mL de hexano em cada tubo. As amostras foram agitadas durante 2 minutos. A fração orgânica foi coletada e o solvente foi evaporado à temperatura ambiente. O resíduo obtido foi armazenado sob refrigeração e protegido da luz.

A quantificação do ergosterol foi realizada de acordo com os métodos de Bomfim et al. (2015), Kohiyama et al. (2015) e Yamamoto-Ribeiro et al. (2013). Os resíduos foram

suspendidos com 2 mL de metanol PA (Merck, Darmstadt, Alemanha) e filtrados através de uma membrana de polietileno (0,45 µm; Millipore). A análise do ergosterol foi realizada em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência Shimatzu HPLC equipado com duas bombas de alta pressão modelo LC-6AD, um detector de matriz de diodos SPD-M20A (DAD), um desgaseificador DGU-20A3 e um injetor automático modelo SIL-10AF com autoamostrador. As separações foram realizadas usando uma coluna Agilent-Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 250 mm, 5 µm), equipada com uma coluna de proteção Agilent-Zorbax Eclipse XDB-C18 de 4 Parck (4,6 x 12,5 mm, 5 µm). A eluição foi realizada por meio de um sistema isocrático de 100% de metanol (grau de HPLC) a uma vazão de 1 mL min⁻¹, volume de injeção de 20 µL e monitoramento a 282 nm. O método padrão externo foi utilizado para quantificação do ergosterol, obtido por regressão linear, correlacionando a área do pico com a concentração da respectiva solução padrão. O coeficiente de determinação (r²) foi de 0,9999, e os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram de 1.461 e 3.523 µg L⁻¹, respectivamente. Para calcular a inibição da produção de ergosterol (%) pelo óleo essencial, foi utilizada a seguinte equação: $I = [(Ec-Et) / Ec] \times 100$, em que Ec é o ergosterol produzido pelo controle fúngico e Et é o ergosterol produzido após tratamento com o óleo essencial.

Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV

As amostras para análise em microscópio eletrônico de varredura foram preparadas a partir das análises do crescimento micelial, no décimo dia de incubação. Foi utilizada uma concentração abaixo da CMF. Três “plugs” foram retirados da colônia (5 mm de diâmetro) e fixados em solução de Karnovsky modificada (glutaraldeído a 2,5%; 2% de formaldeído, tampão de cacodilato 0,05M, pH 7,2 e tampão CaCl₂ 0,001 M, Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brasil), por um período mínimo de 24 horas. As amostras foram lavadas com tampão de cacodilato, por duas vezes de 10 minutos, desidratadas usando uma série de concentrações crescentes de acetona (25, 50, 75 e 100%), sendo expostas duas vezes em acetona 100%, secas em um aparelho de ponto crítico (Bal-tec CPD 030) montadas em Stubs com fita dupla face e revestidas com ouro (Bal-tec CPD 050) (DE OLIVEIRA et al., 2017). As amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura (Leo Evo 040) para obtenção das eletromicrografias.

Análise estatística

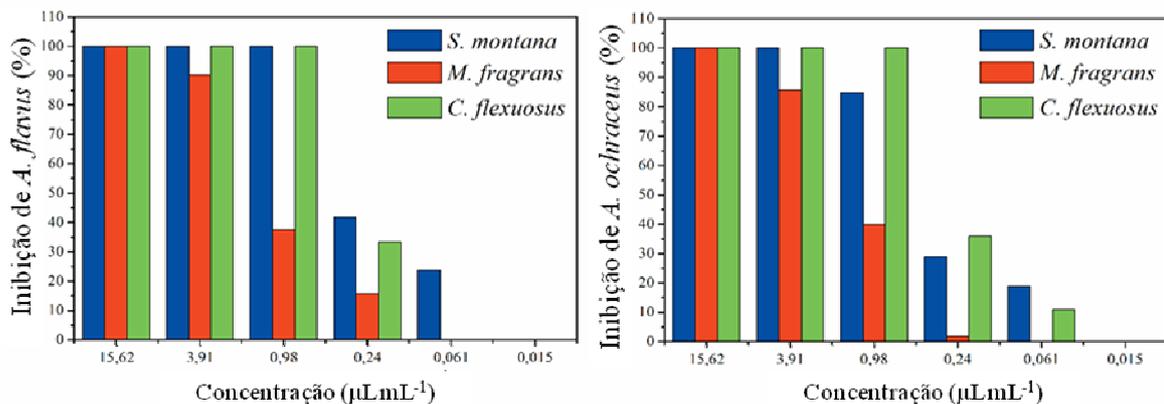
Os resultados referentes ao efeito dos óleos essenciais de *S. montana*, *M. fragrans* e *C. flexuosus* sobre a porcentagem de inibição do crescimento micelial (n=3) da biossíntese de ocratoxina A (n=3) e ergosterol (n=3) foram submetidos à análise de variância, e as médias foram comparadas por meio do Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado (DIC), e o programa estatístico utilizado foi o SISVAR (FERREIRA, 2011).

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atividade antifúngica dos óleos essenciais

Os óleos essenciais em estudo inibiram o crescimento micelial dos fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus* de maneira dose-dependente (Figura 1). O crescimento micelial de *A. flavus* foi inibido completamente pelos óleos essenciais de *S. montana*, *M. fragrans* e *C. flexuosus* nas concentrações de 0,98; 15,62 e 0,98 $\mu\text{L mL}^{-1}$, respectivamente. A espécie *A. ochraceus* não apresentou crescimento nas concentrações de 3,91; 15,62 e 0,98 $\mu\text{L mL}^{-1}$ pelos tratamentos de *S. montana*, *M. fragrans* e *C. flexuosus*, respectivamente. Esses valores são considerados concentrações mínima fungicida (CMF), mostrando que os óleos essenciais em estudo apresentam efeito sobre *A. flavus* e *A. ochraceus*.

Figura 1 - Efeito dos óleos essenciais na inibição do crescimento micelial das espécies *A. flavus* e *A. ochraceus*.



O efeito do óleo essencial no crescimento micelial de microrganismos deve-se à sua natureza lipofílica, pois as diferentes classes de constituintes químicos podem ser responsáveis pelo efeito inibitório no desenvolvimento de microrganismos (BOMFIM et al., 2015).

Segundo relatos na literatura, óleos essenciais constituídos de monoterpenos, como α -pineno, β -pineno, p-cimeno, γ -terpineno, linalol, citral (neral e geranial), compostos com características fenólicas (carvacrol e timol) e fenilpropanoides (eugenol) são considerados por vários autores como os principais compostos responsáveis pelas propriedades antifúngicas do óleo essencial (MOGHADDAM, M.; MEHDIZADEH, L., 2016).

Atividade antimicotoxigênica

A produção de ocratoxina A (OTA) no fungo *A. ochraceus* foi inibida pelos óleos essenciais com um efeito de dose-dependente (Tabela 1). Foi observado efeito significativo ($p < 0,05$) na porcentagem de inibição da produção de OTA em relação a todas as concentrações testadas referentes aos óleos essenciais em estudo. Foi observado que os óleos essenciais de *S. montana* e *C. flexuosus* em baixas concentrações inibiram 100% a produção de ocratoxina A.

Tabela 1 – Efeito dos óleos essenciais na produção de ocratoxina A de *A. ochraceus*.

Concentração ($\mu\text{L mL}^{-1}$)	Inibição de ocratoxina A (%)		
	<i>S. montana</i>	<i>M. fragrans</i>	<i>C. flexuosus</i>
0,015	34,35 \pm 4,46c	31,24 \pm 2,73d	24,52 \pm 2,60c
0,061	49,60 \pm 2,67b	42,68 \pm 1,15c	90,41 \pm 1,48b
0,24	100,00 \pm 0,00a	48,51 \pm 1,83cb	100,00 \pm 0,00a
0,98	100,00 \pm 0,00a	51,88 \pm 2,69b	-
3,91	-	93,72 \pm 5,45a	-

* As médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas não diferem uma da outra pelo teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade.

Os óleos essenciais de *S. montana*, *M. fragrans* e *C. flexuosus* apresentaram um efeito qualitativo na biossíntese de aflatoxinas B₁ e B₂ do fungo *A. flavus*. Foi observada a presença de AFB₁ e AFB₂ no controle fúngico por meio de manchas em placa de sílica utilizada em Cromatografia em Camada Delgada e fluorescência semelhantes às dos padrões comerciais. Entretanto, essas duas manchas não foram observadas nos tratamentos com os óleos essenciais, exceto na menor concentração testada (0,015 $\mu\text{L mL}^{-1}$). As manchas que não

foram observadas nos tratamentos indicam que a biossíntese de micotoxinas produzidas por *A. flavus* foi inibida na presença dos óleos essenciais.

Pode-se observar que os óleos essenciais apresentam boa atividade antimicotoxigênica, pois mesmo inibindo pouco o crescimento micelial nas concentrações mais baixas, os óleos essenciais apresentaram um efeito positivo (inibindo 100%) frente às micotoxinas produzidas pelos fungos *A. ochraceus* e *A. flavus*.

Os constituintes químicos presentes nos óleos essenciais em estudo apresentam diferentes grupos funcionais; portanto, o potencial dos óleos não é atribuído apenas a um mecanismo específico, pois podem existir diversas formas para atacar a célula fúngica. Assim, o efeito positivo dos óleos essenciais na inibição da síntese de micotoxinas possivelmente pode ser atribuído ao sinergismo dos diferentes compostos presentes nos óleos essenciais, segundo estudos realizados por Moghaddam e Mehdizadeh (2016).

Efeito dos óleos essenciais na biossíntese de ergosterol

Os óleos essenciais diminuíram a porcentagem de ergosterol presentes nos fungos *A. flavus* e *A. ochraceus*, e foi observada uma diferença significativa entre os diferentes tratamentos ($p < 0,05$), indicando um efeito dose-dependente (Tabela 2). O ergosterol é o principal e único esterol da membrana celular fúngica, composto fundamental na sobrevivência do microrganismo. É responsável pela fluidez da membrana e fornece o sinal para a divisão celular. Portanto, qualquer efeito nesse metabólito secundário proporciona um desequilíbrio e alterações na fluidez, havendo conseqüentemente, alterações homeostáticas intracelulares. Assim, uma alteração significativa da biossíntese de ergosterol irá inibir o crescimento de fungos, ocasionando sua morte (CHELLAPPANDIAN et al., 2018; PEREIRA et al., 2015).

Tabela 2 - Efeito dos óleos essenciais na síntese de ergosterol das espécies *A. flavus* e *A. ochraceus*.

Concentração ($\mu\text{L mL}^{-1}$)	Inibição do ergosterol (%)					
	<i>Aspergillus flavus</i>			<i>Aspergillus ochraceus</i>		
	<i>S. montana</i>	<i>M. fragrans</i>	<i>C. flexuosus</i>	<i>S. montana</i>	<i>M. fragrans</i>	<i>C. flexuosus</i>
0,015	13,61±0,40c	14,10±0,30e	14,37±0,25c	7,75±1,44d	6,67±0,82e	7,09±2,72c
0,061	56,86±1,73b	36,41±0,10d	46,93±1,10b	32,05±2,30c	14,58±0,63d	46,28±1,81b
0,24	85,56±0,54a	68,23±1,03c	70,18±0,67a	65,40±2,55b	27,84±2,22c	97,50±1,47a
0,98	-	76,95±0,06b	-	97,98±0,24a	68,69±1,45b	-
3,91	-	92,11±0,26a	-	-	97,56±0,63a	-

*As médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas não diferem uma da outra pelo teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade.

Hua et al. (2014), pesquisando sobre efeito dos óleos essenciais de canela (85% de cinamaldeído), *Litsea citrate* (85% de citral), eucalipto (80% de cineol), anis (92% de anetol), hortelã-pimenta (50% de mentol), cânfora (55% de boneol) e os constituintes químicos, cinamaldeído (99%), citral (96%), eugenol (99%), relataram que a presença de monoterpenos em óleos essenciais pode levar à peroxidação lipídica, prejudicando a integridade celular, interrompendo a biossíntese de ergosterol, inibindo o processo respiratório na membrana mitocondrial e diminuindo a virulência de fungos. Alguns agentes antifúngicos atuam na biossíntese do ergosterol das hifas dos fungos (componente lipídico fúngico), e a ausência desse componente induz o colapso da célula fúngica (micélio) e a interrupção do crescimento micelial (corpo fúngico). O estudo de Hua et al. (2014) corrobora com o presente trabalho, uma vez que foram encontrados monoterpenos (borneol, sabineno, geranial e neral) como majoritários nos óleos essenciais em estudo e eles mostraram promissores na redução da biossíntese de ergosterol.

Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV

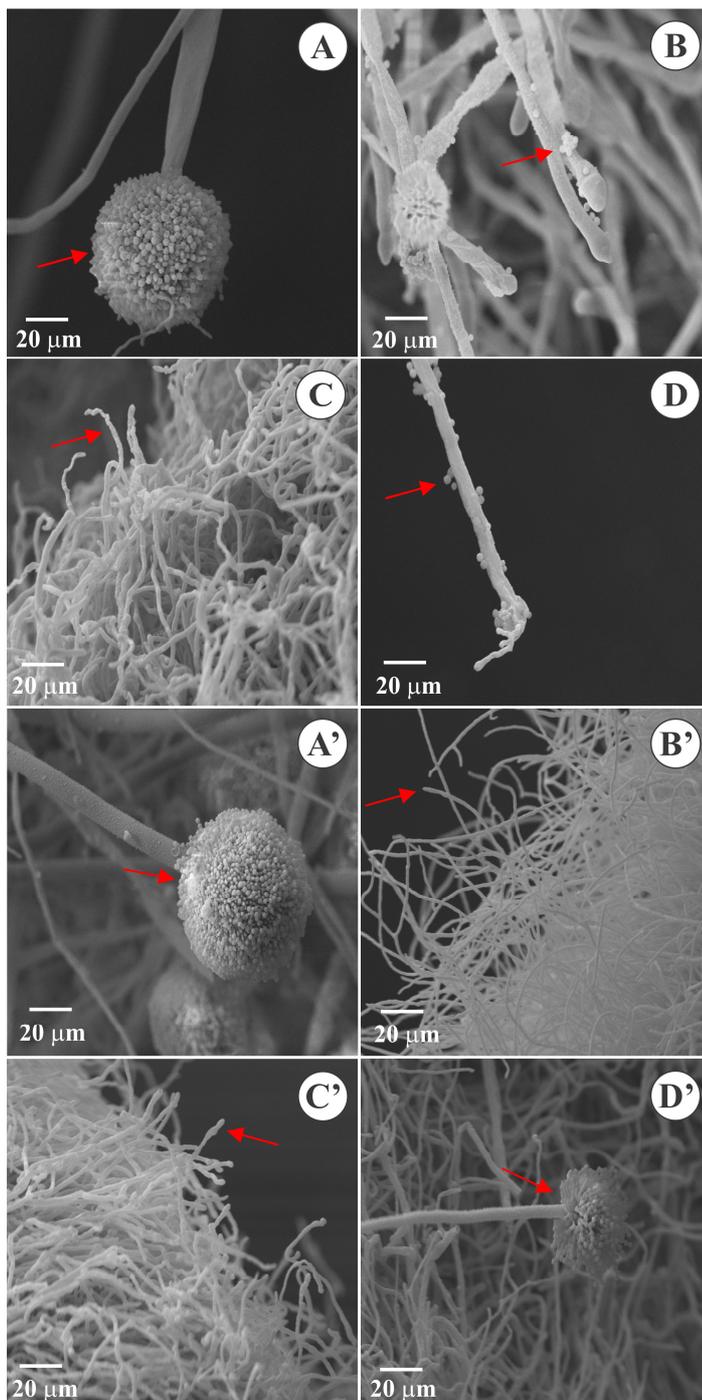
A Figura 2 apresenta as imagens obtidas por MEV das morfologias estruturais de *A. flavus* e *A. ochraceus*. Uma morfologia regular e um desenvolvimento dos conídios, conidióforo e esporos foi observado no controle fúngico de *A. flavus* e *A. ochraceus* (Figuras 2A, 2A'), apresentando hifas uniformes, superfície robusta, lisa e diâmetro constante, linear e regular no micélio. Entretanto, observaram-se alterações na morfologia das amostras tratadas com óleo essencial, quando comparada com os controles fúngicos.

Analisando as eletromicrografias obtidas para *A. flavus*, percebeu-se a deformação, redução e perdas da integridade dos conídios. Alterações na uniformidade das hifas,

apresentando-as colapsadas, enrugadas e diâmetro diminuído foram observadas após os tratamentos com os óleos essenciais de *S. montana* e *C. flexuosus* (Figuras 2B, 2D). Entretanto, para o tratamento com óleo essencial de *M. fragrans* (Figura 2C), foi observada uma completa inibição de esporos e conídios, podendo ser vistos apenas hifas totalmente alteradas morfológicamente.

As eletromicrografias de *A. ochraceus* mostra a não formação de conídios e esporos e alterações na uniformidade dos conidióforos (diâmetro diminuído, agregado de hifas enrugadas, murchas, achatadas e colapsadas) após tratamento com os óleos essenciais de *S. montana* e *M. fragrans* (Figuras 2B', 2C'). O tratamento com o óleo de *C. flexuosus* proporcionou a formação de esporos, porém, com deformações (Figura 2D').

Figura 2 - Eletromicrografias de varredura de *A. flavus* e *A. ochraceus*; A, B, C e D são eletromicrografias de *A. flavus* sem tratamento e tratados com óleos essenciais de *S. montana*, *M. fragrans* e *C. flexuosus*, respectivamente; A', B', C' e D' são eletromicrografias de *A. ochraceus* sem tratamento e tratados com óleos essenciais de *S. montana*, *M. fragrans* e *C. flexuosus*, respectivamente.



Trabalhos de Ju et al. (2020) e Tao et al. (2015) sugeriram que o citral poderia distorcer os micélios, afetando principalmente a morfologia celular, levando ao encolhimento ou atrofia celular. Estudos anteriores de Ouyang et al., (2014) e Wu; Ouyang; Tao, (2016) também demonstraram os efeitos de constituintes, como citronelal e terpineol. Para os autores, estes podem aumentar a permeabilidade da membrana celular, provocando o vazamento de conteúdos intracelulares.

4 – CONCLUSÃO

Os óleos essenciais de *S. montana*, *M. fragrans* e *C. flexuosus* apresentaram efeitos fungicida e fungistático e atividade antimicotoxigênica sobre *A. flavus* e *A. ochraceus*. Os óleos essenciais também foram capazes de inibir a biossíntese de ergosterol, causar danos e deformações na integridade morfológica dos fungos *A. flavus* e *A. ochraceus*. Esses resultados indicam que os óleos essenciais em estudo poderão ser utilizados como conservantes de alimentos, pois apresentaram um efeito contra a proliferação de fungos toxigênicos que contaminam alimentos. Além disso, inibem a síntese de micotoxinas (Ocratoxina A, Aflatoxina B₁ e B₂), garantindo segurança alimentar ao consumidor.

AGRADECIMENTOS

Ao apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) na forma da Bolsa de Produtividade e recursos financeiros; à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), e à Fundação de Amparo em Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig) pelo apoio financeiro.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os óleos essenciais são substâncias que apresentam composição química variada, podendo ser aplicados em diversas áreas industriais, devido às suas diversas propriedades biológicas. O óleo essencial de *S. montana* é promissor na inibição de AChE, repelente, antimicrobiano, inibidor de toxinas e síntese de ergosterol. O óleo essencial de *C. flexuosus* é eficaz como repelente, antimicrobiano e inibidor de toxinas e síntese de ergosterol.

5 - REFERÊNCIAS

ABDEL-AZIZ, M. M.; EMAM, T. M.; ELSHERBINY, E. A. Effects of mandarin (*Citrus reticulata*) peel essential oil as a natural antibiofilm agent against *Aspergillus niger* in onion bulbs. **Postharvest Biology and Technology**, v. 156, p. 110959, 2019.

BOMFIM, N. S. et al. Antifungal activity and inhibition of *fumonisin* production by *Rosmarinus officinalis* L. essential oil in *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg. **Food Chemistry**, v. 166, p. 330-336, Jan. 2015.

CHELLAPPANDIAN, M. et al. Traditionally practiced medicinal plant extracts inhibit the ergosterol biosynthesis of clinically isolated dermatophytic pathogens. **J. Mycol. Med.**, v. 28, p. 143-149, 2018.

DE OLIVEIRA, M. et al. Morphological alterations in sessile cells of *Listeria monocytogenes* after treatment with *Cymbopogon* sp. essential oils. **Magistra**. 2017;26:385-392.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Cienc Agrotec**. 2011; 35: 1039-1042.

FREIRE, L. et al. Influence of physical and chemical characteristics of wine grapes on the incidence of *Penicillium* and *Aspergillus* fungi in grapes and ochratoxin A in wines. **International Journal of Food Microbiology**, v. 241, p. 181-190, 2017.

GU, S.; WANG, J.; WANG, Y. Early discrimination and growth tracking of *Aspergillus* spp. contamination in rice kernels using electronic nose. **Food chemistry**, v. 292, p. 325-335, 2019.

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

HUA, H. et al. Inhibitory effect of essential oils on *Aspergillus ochraceus* growth and ochratoxin A production. **Journal PLOS One**, v. 9, n. 9, p. e108285, Sep. 2014.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Chemical agents and related occupations. IARC Monographs on the evaluation carcinogenic risks to humans. 2012; 100F: 225-244.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC Monographs on the evaluation carcinogenic risks to humans. 1993; 56: 489-421.

JAHANI, M.; PIRA, M.; AMINIFARD, M. H. Antifungal effects of essential oils against *Aspergillus niger* in vitro and in vivo on pomegranate (*Punica granatum*) fruits. **Scientia Horticulturae**, v. 264, p. 109188, 2020.

JU, J. et al. Synergistic inhibition effect of citral and eugenol against *Aspergillus niger* and their application in bread preservation. **Food Chemistry**, v. 310, p. 125974, 2020.

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

KOHIYAMA, C. Y. et al. Antifungal properties and inhibitory effects upon aflatoxin production of *Thymus vulgaris* L. by *Aspergillus flavus* Link. **Food Chemistry**, v. 173, p. 1006-1010, April 2015.

MOGHADDAM, M.; MEHDIZADEH, L. Essential Oil and Antifungal Therapy. **Recent Trends in Antifungal Agents and Antifungal Therapy**, 2016.

OLIVEIRA, R. C., et al. Cellular, physiological and molecular approaches to investigate the antifungal and anti-aflatoxigenic effects of thyme essential oil on *Aspergillus flavus*. **Food Chemistry**, v. 315, p. 126096, 2020.

OUYANG, Q. L. et al. Inhibitory effect of alpha-terpineol on *Penicillium italicum*. **Journal of Food Science**, v. 11, p. 7-15, 2014.

PASSAMANI, F. R. et al. Effect of temperature, water activity, and pH on growth and production of ochratoxin A by *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* from Brazilian grapes. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 77, n. 11, p. 1947–1952, Nov. 2014.

PEREIRA, F. D. O. et al. Antifungal activity of geraniol and citronellol, two monoterpenes alcohols, against *Trichophyton rubrum* involves inhibition of ergosterol biosynthesis. *Pharm. Biol.* 53, 228-234, 2015.

SALDAN, N. C., et al. Development of an analytical method for identification of *Aspergillus flavus* based on chemical markers using HPLC-MS. **Food chemistry**, v. 241, p. 113-121, 2018.

SILVA, R. R.; CORSO, C. R.; MATHEUS, D. R. Effect of culture conditions on the biomass determination by ergosterol of *Lentinus crinitus* and *Psilocybe castanella*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 5, p. 841-846, May 2010.

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

TAO, N. G. et al. Inhibitory effects of citral and octanal mixture on *Penicillium digitatum*. **Modern Food Science and Technology**, v. 31, n. 6, p. 73-77, 2015.

TOYOTOME, T. et al. Prospective survey of *Aspergillus* species isolated from clinical specimens and their antifungal susceptibility: A five-year single-center study in Japan. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 26.2, p. 321-323, 2020.

WANG, H. et al. Comparative seasonal variation and chemical composition of essential oils from the leaves and stems of *Schefflera heptaphylla* using microwave-assisted and conventional hydrodistillation. **Industrial Crops and Products**, Philadelphia, v. 36, n. 1, p. 229- 237, Mar. 2012.

WU, Y.; OUYANG, Q.; TAO, N. Plasma membrane damage contributes to antifungal activity of citronellal against *Penicillium digitatum*. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 10, p. 3853-3858, 2016.

YAMAMOTO-RIBEIRO, M. M. G et al. Effect of *Zingiber officinale* essential oil on *Fusarium verticillioides* and fumonisin production. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 3147-3152, Dec. 2013.

ZHANG, X. et al. A study on accumulation of volatile organic compounds during ochratoxin a biosynthesis and characterization of the correlation in *Aspergillus carbonarius* isolated from grape and dried vine fruit. **Food chemistry**, v. 227, p. 55-63, 2017.