



KAREN CAROLINE CAMARGO

ÓLEO ESSENCIAL DE *Cantinoa Carpinifolia* Benth.:
COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ESTUDO DO MECANISMO DE
AÇÃO SOBRE *Escherichia coli* E *Staphylococcus aureus*

LAVRAS – MG

2018

KAREN CAROLINE CAMARGO

ÓLEO ESSENCIAL DE *Cantinoa Carpinifolia* Benth.: COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO SOBRE *Escherichia coli* E *Staphylococcus aureus*

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

Profa. Dra. Maria das Graças Cardoso

Orientadora

LAVRAS – MG

2018

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

Camargo, Karen Caroline.

Óleo essencial de *Cantinoa carpinifolia* Benth : composição química e estudo do mecanismo de ação sobre *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* / Karen Caroline Camargo. - 2018.

70 p. : il.

Orientador(a): Maria das Graças Cardoso.

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

Bibliografia.

1. Óleo essencial. 2. *Cantinoa carpinifolia*. 3. Potencial antibacteriano. I. Cardoso, Maria das Graças. . II. Título.

KAREN CAROLINE CAMARGO

ÓLEO ESSENCIAL DE *Cantinoa Carpinifolia* Benth.: COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO SOBRE *Escherichia coli* E *Staphylococcus aureus*

ESSENTIAL OIL OF *Cantinoa Carpinifolia* Benth.: CHEMICAL COMPOSITION AND STUDY OF THE MECHANISM OF ACTION ON *Escherichia coli* E *Staphylococcus aureus*

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

APROVADA em 19 de fevereiro de 2018

Dra. Ana Cristina da Silva Figueiredo - Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

Dr. Luís Roberto Batista – Universidade Federal de Lavras

Profa. Dra. Maria das Graças Cardoso

Orientadora

LAVRAS – MG

2018

A Deus, por todas as bênçãos derramadas em minha vida, e aos meus pais (João e Eloisa), pela dedicação e amor incondicional.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pelo suporte financeiro e à Universidade Federal de Lavras, juntamente com todos os professores e técnicos.

A Deus, por me conceder o dom da vida, pelas oportunidades, por me dar ânimo e coragem para enfrentar cada desafio e, além de tudo, colocar anjos na forma de pessoas à minha disposição.

Dentre esses anjos, agradeço: meus pais, João e Eloísa, e meu noivo, Júnio, por serem meus amparos. Meu irmão Marcel, minha irmã de coração Marcela e meus queridos sobrinhos Gabi, Clara e Miguel, que com toda pureza em seus corações tornam meus dias mais felizes.

À minha orientadora, Maria das Graças Cardoso, pela orientação e suporte desde a iniciação científica e por apoiar todos os meus sonhos.

Ao professor Luís Roberto Batista, pela coorientação, participação na banca e por ter aberto as portas do Laboratório de Micologia e Micotoxina de Alimentos da UFLA, para a execução dos experimentos.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade em contribuir com o trabalho.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural da UFLA e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), pelo fornecimento dos equipamentos e suporte técnico para experimentos envolvendo microscopia eletrônica.

À Stefany, por toda a paciência e ajuda com as eletromicrografias.

À estatística Bruna Faria, pela ajuda com as análises estatísticas.

Aos amigos do Laboratório, Wilder, Juliana, Maria Luisa, Manuel, Gabriel, Danúbia, Rafa Brandão, Maísa, Rafa Zaniti, Alex, Alan, Luana, Jéssica, Eduarda, Richard, Gustavo, e em especial, às minhas companheiras de mestrado, Rafa Vieira e Vanuzia.

Por fim, a todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a concretização do presente trabalho.

RESUMO

No presente trabalho objetiva-se caracterizar quimicamente o óleo essencial de *Cantinoa carpinifolia* Benth., avaliar seu potencial antibacteriano e realizar um estudo preliminar do seu mecanismo de ação sobre *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. A extração do óleo essencial foi realizada pela técnica de hidrodestilação, utilizando-se o aparelho de Clevenger modificado. A caracterização química foi feita por meio de um Cromatógrafo Gasoso acoplado a um espectrômetro de massas e os compostos foram quantificados por cromatografia em fase gasosa com detector por ionização de chamas. A atividade antibacteriana foi avaliada pela técnica de macrodiluição, sendo realizado um estudo do tempo de morte celular. O mecanismo de ação antibacteriana foi estudado por meio de testes baseados na avaliação da permeabilidade (efluxo de potássio e tolerância a sal) e integridade (liberação de materiais celulares) da membrana celular bacteriana, bem como foram avaliados os efeitos sobre a superfície das células por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Os constituintes majoritários que caracterizaram o óleo essencial de *C. carpinifolia* foram os monoterpenos α - tujona (38,14%), β - tujona (22,43%), sabineno (5,00%) e *cis*- pinocanfeno (5,55%) e o sesquiterpeno β - cariofileno (7,28%). Nas concentrações de 6,25 e 0,39 $\mu\text{L mL}^{-1}$, o óleo essencial mostrou-se bactericida e bacteriostático sobre *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente, sendo as cepas bacterianas completamente inativadas nos tempos de 135 (*E. coli*) e 197 min (*S. aureus*). O óleo essencial em estudo não provocou efluxo de potássio nem extravasamento de materiais celulares. Além disso, não houve alteração da capacidade de tolerância a sal. Por meio das eletromicrografias, foi possível perceber os efeitos nocivos sobre ambas as bactérias, embora não pôde ser observado o rompimento da membrana celular. Dessa forma, o óleo essencial de *C. carpinifolia* apresentou atividade biológica sobre as bactérias avaliadas; no entanto, mostrou não provocar danos na membrana celular de *E. coli* e *S. aureus* por nenhum dos testes realizados, levantando a hipótese de que o alvo de ação foi intracelular.

Palavras-chave: Óleo essencial. *Cantinoa carpinifolia*. Potencial antibacteriano. Mecanismo de ação.

ABSTRACT

The present work sought to characterize the essential oil from *Cantinoa carpinifolia* Benth. to evaluate its antibacterial potential and to perform a preliminary study of its mechanism of action against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The extraction of the essential oil was accomplished by the hydrodistillation technique, using a modified Clevenger apparatus. The chemical characterization was achieved by means of a gas chromatograph coupled to a mass spectrometer, and the compounds were quantified by gas chromatography with a flame ionization detector. The antibacterial activity was evaluated by the macrodilution technique, wherein the time necessary for cell death was determined. The mechanism of antibacterial action was studied by means of tests based on the evaluation of the permeability (potassium efflux and salt tolerance) and integrity (release of cellular materials) of the bacterial cell membrane, as well as determination of the effects on the surface of the cells by Scanning Electron Microscopy (SEM). The principal constituents that characterized the essential oil of *C. carpinifolia* were the monoterpenes α -tujone (38.14%), β -tujone (22.43%), sabinene (5.00%) and *cis*- pinocanphene (5.55 %) and the sesquiterpene β -caryophyllene (7.28%). Bactericidal and bacteriostatic activities against *E. coli* and *S. aureus*, respectively, were observed at essential oil concentrations of 6.25 and 0.39 $\mu\text{L mL}^{-1}$. The bacterial strains were completely inactivated after 135 (*E. coli*) and 197 min (*S. aureus*). No efflux of potassium or extravasation of cellular materials was observed upon treatment with the essential oil. In addition, there was no change in salt tolerance. By means of electromicrographs it was possible to perceive the harmful effects on both bacteria, although the rupture of the cellular membrane could not be observed. Thus, the essential oil from *C. carpinifolia* presented biological activity against the evaluated bacterium; however, it did not cause damage to the cell membranes of *E.coli* and *S. aureus* in any of the tests performed.

Keywords: Essential oil. *Cantinoa carpinifolia*. Antibacterial potential. Mechanism of action.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Fatores edafoclimáticos que influenciam o teor de metabólitos secundários de plantas.	15
Figura 2- Biossíntese de metabólitos secundários.	16
Figura 3- Estrutura química básica dos fenilpropanoides.	18
Figura 4- Biossíntese dos fenilpropanoides. (Continua)	18
Figura 5- Estrutura química básica do isopreno.	21
Figura 6- Biossíntese dos terpenos pela via do mevalonato. (Continua)	22
Figura 7- Biossíntese dos terpenos pela via DXPS. (Continua)	24
Figura 8- Esquema dos possíveis alvos celulares bacteriano afetados pelos óleos essenciais.	30
Figura 9- Aspecto geral da espécie <i>Cantinoa carpinifolia Benth.</i>	31
Figura 10- Principais microrganismos associados a contaminação de alimentos no Brasil, entre os anos de 2007 e 2016.	32
Figura 11- Aspecto geral da bactéria <i>Salmonella enterica</i>	33
Figura 12- Aspecto geral da bactéria <i>Escherichia coli</i>	34
Figura 13- Aspecto geral da bactéria <i>Staphylococcus aureus</i>	35
Figura 14- Esquema geral dos mecanismos de ação de alguns antibióticos sintéticos.	36
Figura 15- Imagens obtidas por microscopia através da técnica de coloração de Gram. A-....	39
Figura 16 - Esquema geral de diluição do inóculo.	39
Figura 17- Esquema geral para o teste de macrodiluição.	40
Figura 18- Esquema geral para o teste de viabilidade celular.	41
Figura 19 - Esquema geral para o teste de viabilidade celular.	42
Figura 20- Esquema geral para o teste de liberação de íons potássio, utilizando-se o método de fotometria de chama.	43
Figura 21 - Esquema geral para o teste de liberação de ácidos nucleicos.	44
Figura 22- Esquema geral para o teste de capacidade de tolerância a sal.	45
Figura 23- Estrutura química dos compostos presentes no óleo essencial.	48
Figura 24- Ensaio de determinação da CIM do óleo essencial <i>C. carpinifolia</i> sobre as bactérias <i>E. coli</i> (A) e <i>S. aureus</i> (B).	50
Figura 25 - Efeito do óleo essencial de <i>C. carpinifolia</i> sobre a viabilidade celular bacteriana de <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> em relação ao tempo.	52
Figura 26- Estrutura química dos compostos constituintes biciclogermacreno (1), δ - 2- carene (2) e α - pineno (3).	55
Figura 27- Efeito do óleo essencial de <i>C. carpinifolia</i> na capacidade de tolerância a sal de <i>E. coli</i>	56
Figura 28- Efeito do óleo essencial de <i>C. carpinifolia</i> na capacidade de tolerância a sal de <i>S. aureus</i>	57
Figura 29- Eletromicrografias de células de <i>E. coli</i> sem (A) e com (B) tratamento do óleo essencial de <i>C. carpinifolia</i> na CMI.	58
Figura 30- Eletromicrografias de células de <i>S. aureus</i> sem (A) e com (B) tratamento do óleo essencial de <i>C. carpinifolia</i> na CMI.	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Constituição química do óleo essencial extraído das folhas de <i>C. carpinifolia</i>	47
Tabela 2- Efeito do óleo essencial de <i>C. carpinifolia</i> no efluxo de íons potássio de <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> , avaliado utilizando-se o kit Cálcio/Potássio.	49
Tabela 3- Efeito do óleo essencial de <i>C. carpinifolia</i> no efluxo de íons potássio de <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> pelo método de Fotometria de chama.	50
Tabela 4- Efeito do óleo essencial de <i>C. carpinifolia</i> na liberação de ácidos nucleicos de <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	51

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1 Metabólitos secundários de plantas	14
2.2 Óleos essenciais	16
2.2.1 Biossíntese dos constituintes presentes nos óleos essenciais	17
2.2.2 Atividade antibacteriana dos óleos essenciais e algumas metodologias utilizadas para avaliação	26
2.2.3 Mecanismo de ação antibacteriana dos óleos essenciais.....	28
2.3 <i>Cantinoa carpinifolia</i> Benth. (rosmaninho).....	30
2.4 Doenças Transmitidas por Alimentos.....	31
2.5 Principais bactérias de origem alimentar	33
2.5.1 <i>Salmonella</i> sp	33
2.5.2 <i>E. coli</i>	34
2.5.3 <i>S. aureus</i>	35
2.6 Antimicrobianos sintéticos	36
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1 Obtenção do material vegetal e extração do óleo essencial de <i>C. carpinifolia</i>	37
3.2 Caracterização química do óleo essencial de <i>C. carpinifolia</i>	37
3.3 Determinação da atividade antibacteriana do óleo essencial de <i>C. carpinifolia</i>	38
3.3.1 Cepas bacterianas	38
3.3.2 Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) do óleo essencial de <i>C. carpinifolia</i> sobre <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	40
3.3.3 Efeito do óleo essencial de <i>C. carpinifolia</i> na viabilidade celular bacteriana.....	41
3.3.4 Efeito do óleo essencial de <i>C. carpinifolia</i> na liberação de íons potássio	41
3.3.5 Efeito do óleo essencial de <i>C. carpinifolia</i> na liberação de constituintes celulares absorventes a 260 nm	43
3.3.6 Efeito do óleo essencial de <i>C. carpinifolia</i> na capacidade de tolerância a sal	44
3.3.7 Efeitos morfológicos provocados pelo óleo essencial de <i>C. carpinifolia</i> nas bactérias <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	45
3.4 Análise estatística	46
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1 Caracterização química do óleo essencial de <i>C. carpinifolia</i>	46
4.2 Concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) do óleo essencial de <i>C. carpinifolia</i> sobre <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	49

4.3 Efeito do óleo essencial de <i>C. carpinifolia</i> sobre a viabilidade celular de <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> em relação ao tempo	52
4.4 Efeito do óleo essencial de <i>C. carpinifolia</i> na permeabilidade e integridade da membrana celular bacteriana de <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	53
4.5 Efeito do óleo essencial de <i>C. carpinifolia</i> na capacidade de tolerância a sal de <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	56
4.6 Efeitos morfológicos provocados pelo óleo essencial de <i>C. carpinifolia</i> nas bactérias <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	58
5 Conclusões.....	60
REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

As Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) representam um grave problema de saúde pública. São caracterizadas por geralmente apresentarem um quadro de anorexia, náuseas e diarreia, ocasionado pela ingestão de alimentos ou água contaminados.

Dentre os principais agentes de contaminação, encontram-se as bactérias, uma vez que podem atuar sobre diferentes substratos e em uma ampla faixa de pH e de temperatura, facilitando, assim, sua disseminação. As espécies *Salmonella* ssp, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* são as principais responsáveis pelos maiores números de surtos no Brasil, relatados nos últimos 10 anos (BRASIL, 2016).

Além desses danos relacionados à saúde dos consumidores, as contaminações de alimentos acarretam grandes perdas econômicas, resultando em prejuízos imensuráveis pelas indústrias alimentícias.

Como forma de controlar esses microrganismos, os antibióticos sintéticos, bem como os desinfetantes, antissépticos e conservantes, são os mais empregados. Entretanto, diversas pesquisas relatam que o uso contínuo desses produtos pode selecionar cepas bacterianas resistentes, sendo necessário o aumento da dosagem a cada aplicação. Diante disso, e sabendo que esses produtos, quando usados de forma incorreta, estão relacionados a danos à saúde do homem e ao meio ambiente, surge a necessidade de sua substituição por produtos naturais que sejam menos agressivos e ecologicamente seguros.

Nesse contexto, enquadram-se os óleos essenciais, que são metabólitos secundários, compostos por uma mistura de substâncias voláteis, líquidas e odoríferas.

Dentre as diversas propriedades biológicas que os óleos essenciais apresentam, destacam-se como potentes antimicrobianos. Entretanto, para acentuar o uso desses compostos, torna-se necessária a elucidação do seu mecanismo de ação, permitindo prever seus efeitos e a maneira como interagem com o microrganismo.

A espécie *Cantinoa carpinifolia* Benth, popularmente conhecida como rosmaninho, é uma planta pertencente à família Lamiaceae, podendo ser encontrada entre diversas formações vegetais, como cerrados, campos sujos, campos limpos, campos rupestres, bordas de matas de galeria e de encosta. Na medicina popular, é utilizada no tratamento de doenças como gripes, resfriados e reumatismo.

Objetivou-se no presente estudo extrair e caracterizar quimicamente o óleo essencial de *Cantinoa carpinifolia*, avaliar seu potencial antibacteriano e elucidar seu mecanismo de ação sobre as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

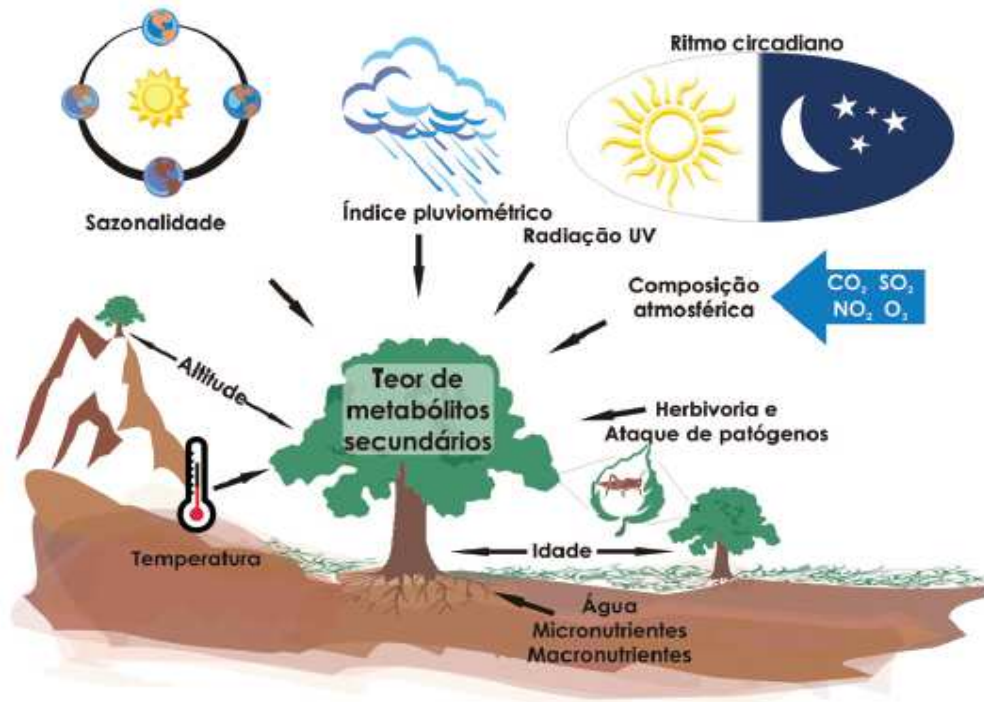
2.1 Metabólitos secundários de plantas

Desde os primórdios, o homem primitivo buscava na natureza soluções para suas necessidades básicas de sobrevivência, como alimentação, proteção e moradia, possibilitando-os à descoberta de plantas e ervas eficientes no tratamento de suas doenças e ferimentos (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Com o decorrer dos anos e avanço da química, as substâncias bioativas presentes nessas plantas foram identificadas e isoladas, permitindo o desenvolvimento de medicamentos com atividade terapêutica ainda maior. Essas substâncias são derivadas do metabolismo secundário das plantas, apresentando-se com estruturas de baixo peso molecular, responsáveis por atividades biológicas marcantes exercidas pelas plantas (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Esses compostos, conhecidos como metabólitos secundários, são de fundamental importância na interação entre as plantas e o meio ambiente. Podem ser sintetizados em estágios específicos de crescimento ou em períodos de estresse provocados por algum agente externo, como clima e ataque de patógenos, desempenhando, assim, um papel protetor contra esses agentes. De acordo com Gobbo-Neto e Lopes (2007), o teor de metabólitos secundários nas plantas pode variar de acordo com o clima, sazonalidade, disponibilidade hídrica, exposição à radiação UV, variação na composição química do solo, poluição atmosférica, bem como com a indução de estímulos mecânicos e ataque de patógenos (Figura 1).

Figura 1- Fatores edafoclimáticos que influenciam o teor de metabólitos secundários de plantas.

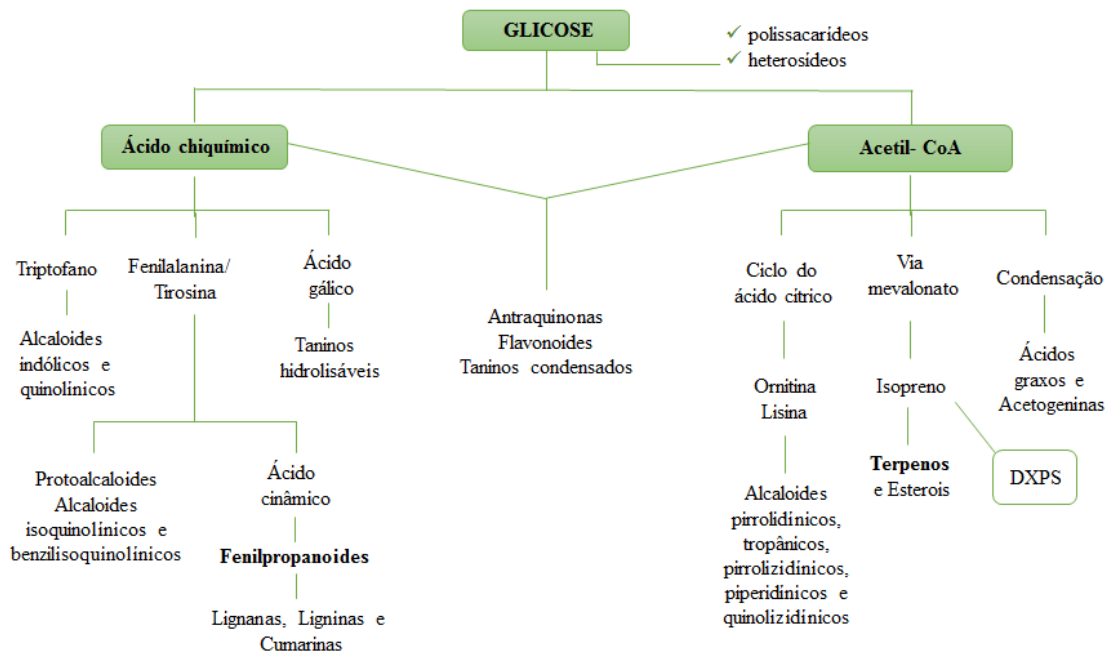


Fonte: Gobbo-Neto e Lopes (2007)

Além da sua importância biológica, os metabólitos secundários apresentam importantes atividades farmacológicas, podendo ser aplicados nas indústrias farmacêuticas, de alimentos, agrônômica e na perfumaria.

A biossíntese desses compostos ocorre a partir do metabolismo da glicose, via dois precursores básicos: o ácido chiquímico e o acetato, conforme mostrado na Figura 2 (SIMÕES et al., 2007).

Figura 2- Biossíntese de metabólitos secundários.



Fonte: Adaptado de Simões et al., 2007.

Partindo-se do ácido chiquímico, são formados compostos que possuem um anel aromático em sua estrutura, como os alcaloides aromáticos, os fenilpropanoides, as cumarinas e os taninos hidrolisáveis. Pela via do acetato, são formados ácidos graxos, terpenos, esteróis e aminoácidos alifáticos com seus derivados alcaloides.

2.2 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são metabólitos secundários classificados pela ISO (International Standard Organization) como “produtos obtidos de partes de plantas por meio de destilação por arraste com vapor d’água, bem como produtos obtidos por expressão dos pericarpos de frutos cítricos” (SIMÕES et al., 2007).

Os óleos essenciais também podem ser chamados de óleos voláteis, óleos etéreos ou essências, uma vez que são formados por uma mistura complexa de substâncias voláteis, lipofílicas e que, geralmente, exalam um odor agradável. Além dessas características, apresentam-se como líquidos, à temperatura ambiente, e incolores ou levemente amarelados (SIMÕES et al., 2007).

Podem ser sintetizados em diversas partes das plantas, como nas folhas, flores, caule, galhos finos, sementes, frutos, raízes e em cascas, sendo armazenados em pelos glandulares,

bolsas lisígenas ou esquizolisígenas, canais oleíferos ou em células parenquimáticas diferenciadas (SIMÕES et al., 2007).

Os óleos essenciais podem conter vários constituintes químicos diferentes, cada qual em diferentes concentrações, sendo, geralmente, um ou dois em maior quantidade (compostos majoritários); outros em proporções moderadas (compostos minoritários) e aqueles cujas concentrações são mínimas (traços). Em termos de estrutura química, são compostos, principalmente, por carbono, hidrogênio e oxigênio. Alguns constituintes apresentam-se como aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, entre outros (SIMÕES et al., 2007).

Ressalta-se ainda que, como todo metabólito secundário, a composição de um óleo essencial extraído de uma mesma espécie pode variar de acordo com sua localização e com fatores extrínsecos, como temperatura, clima e sazonalidade (SIMÕES et al., 2007).

Os óleos essenciais apresentam atividades biológicas diversificadas, refletindo o próprio papel que exercem nas plantas. Podem atuar como agentes antioxidantes, antibacterianos, antifúngicos, inseticidas, alelopáticos, dentre outros (SIMÕES et al., 2007).

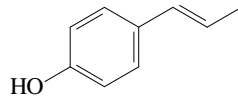
Essas propriedades vêm sendo cada vez mais exploradas pelos diferentes ramos industriais, destacando-se na indústria alimentícia, na conservação e incremento de aroma e sabor dos alimentos, na indústria farmacêutica, devido às suas propriedades antissépticas, digestivas, sedativas e analgésicas; e na indústria de cosméticos, atuando como base para sabonetes, cremes e perfumes (EL ASBAHANI et al., 2015).

2.2.1 Biossíntese dos constituintes presentes nos óleos essenciais

Os constituintes dos óleos essenciais são derivados de fenilpropanoides e de terpenos, formados a partir da via do ácido chiquímico e da via do acetato, respectivamente (SIMÕES et al., 2007).

Os fenilpropanoides (Figura 3) são compostos aromáticos que apresentam uma cadeia lateral com três átomos de carbono ligada ao anel aromático. São formados, pela via do ácido chiquímico, na qual os aminoácidos a fenilalanina e tirosina, por ação da enzima fenilalanina amonialiase (FAL), liberam uma molécula de amônia, formando as unidades básicas dos ácidos cinâmicos e p-cumárico que, por sua vez, produzem através de reações de redução, oxidação, e ciclização, os fenilpropanoides. O mecanismo de formação dos fenilpropanoides está descrito na Figura 4. (SIMÕES et al., 2007).

Figura 3- Estrutura química básica dos fenilpropanoides.



Fonte: Do autor (2018).

Figura 4- Biossíntese dos fenilpropanoides. (Continua)

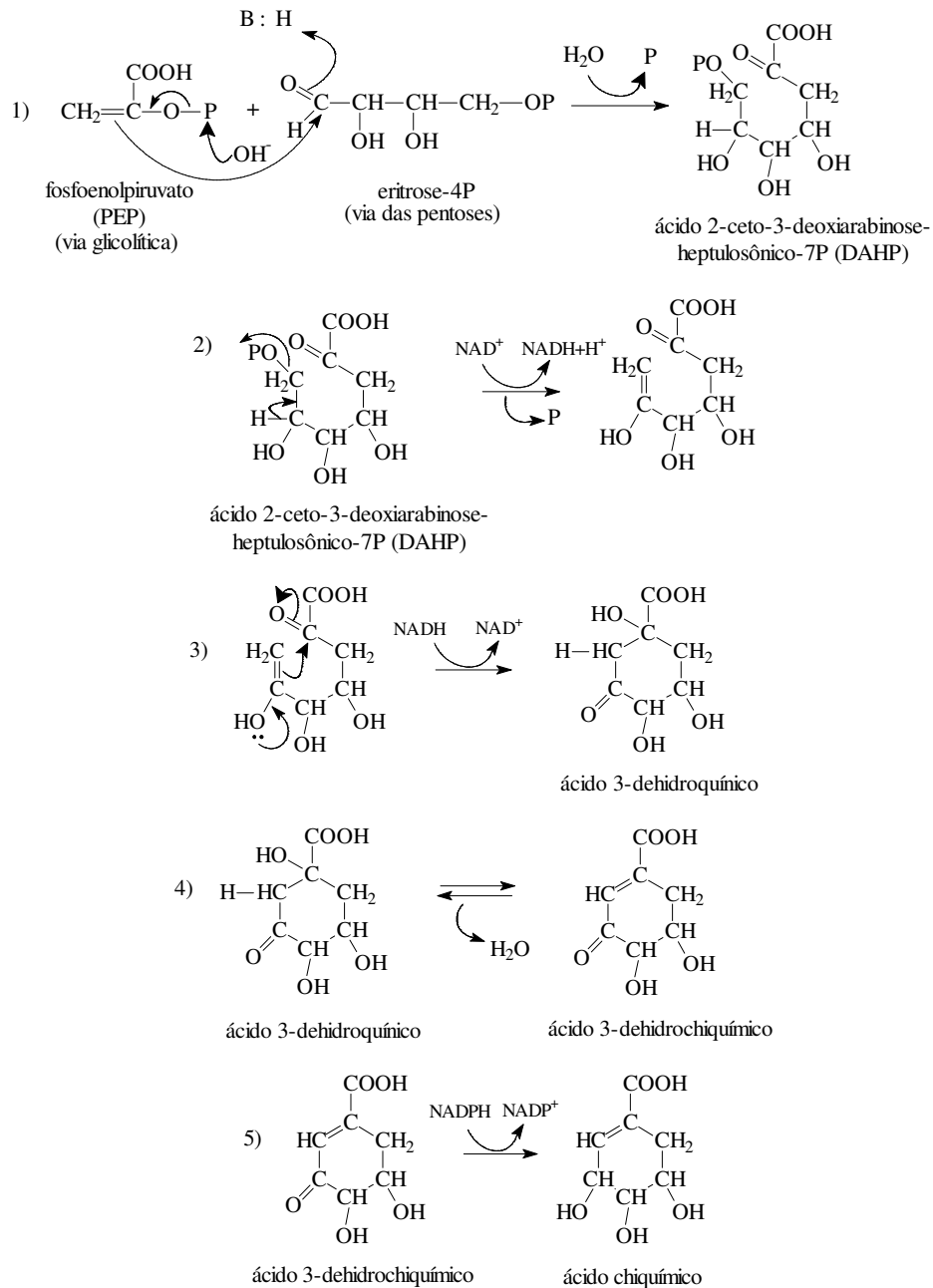


Figura 4- Biossíntese dos fenilpropanoides. (Continua)

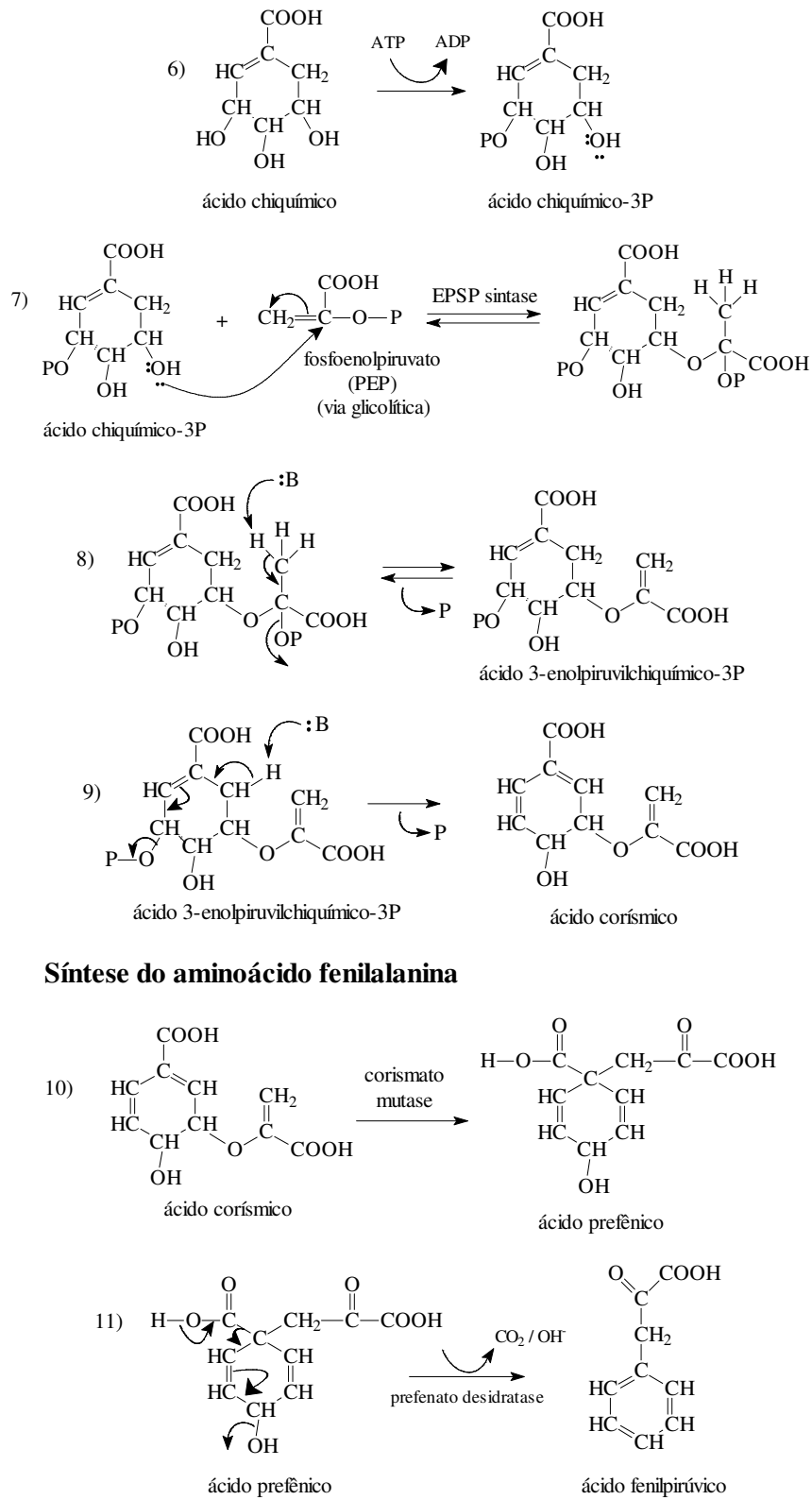


Figura 4- Biossíntese dos fenilpropanoides. (Continua)

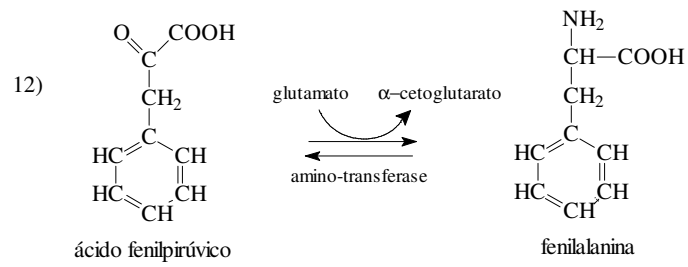
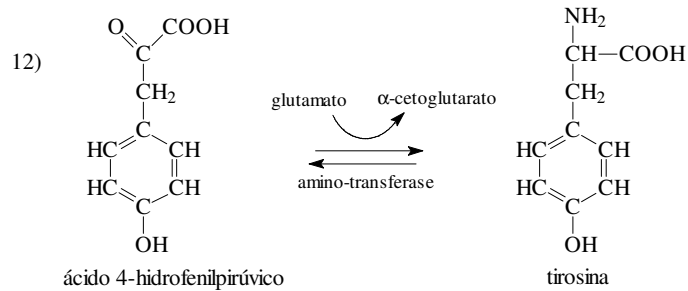
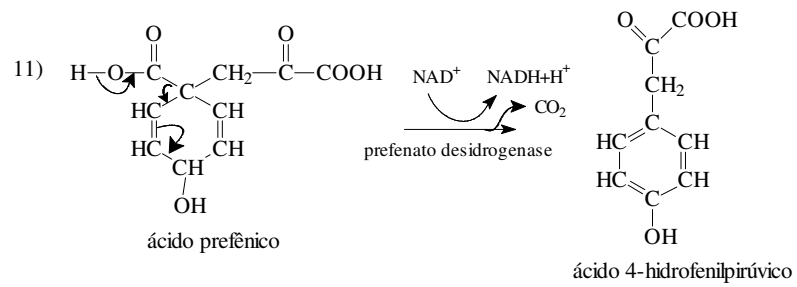
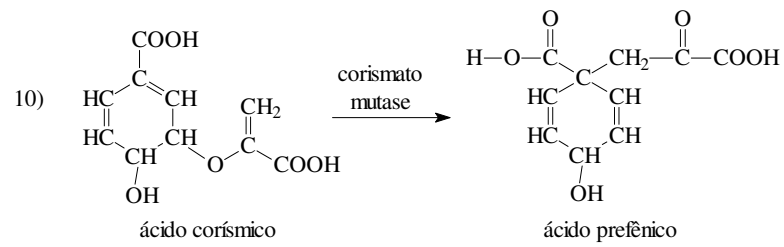
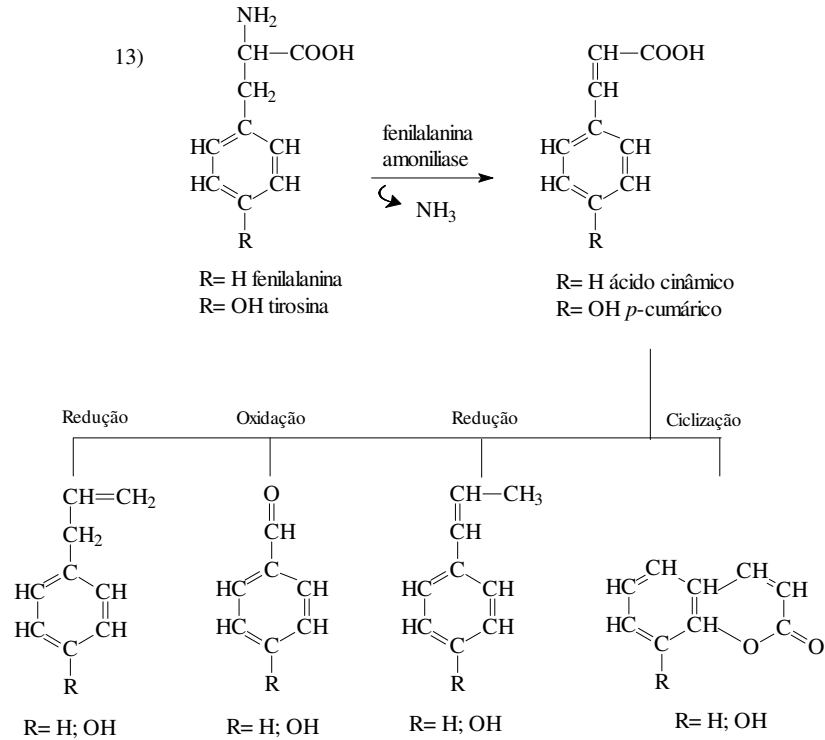
**Síntese do aminoácido tirosina**

Figura 4- Biossíntese dos fenilpropanoides. (Conclusão)

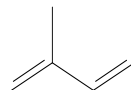
**Síntese dos fenilpropanoides a partir dos aminoácidos
fenilalanina e tirosina**



Fonte: Teixeira (2016).

Os terpenos são compostos por unidades de isopreno (2-metilbuta-1,3-dieno), podendo apresentar-se como seus isômeros saturados ou parcialmente saturados, bem como seus derivados oxigenados, como álcoois, aldeídos, cetonas, fenóis, éteres e ésteres, sendo, neste último caso, chamados de terpenoides. O isopreno (Figura 5) apresenta em sua estrutura química cinco átomos de carbono distribuídos em uma cadeia ramificada ligada por duas ligações simples e duas ligações duplas (SIMÕES et al., 2007).

Figura 5- Estrutura química básica do isopreno.



Fonte: Do autor (2018).

As unidades isoprênicas são formadas a partir da via do mevalonato ou da via DXPS, sofrem condensação e, por sua vez, formam os esqueletos carbonados dos terpenos (DEWICK, 2009).

A via do ácido mevalônico pode ser esquematizada de acordo com a Figura 6. A biossíntese inicia-se com a formação de acetoacetyl-CoA, por meio de uma condensação aldólica de duas moléculas de acetyl-CoA, catalisada pela enzima acetoacetyl-CoA sintase. Por sua vez, o acetoacetyl-CoA combina-se com outra molécula de acetyl-CoA, formando o β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA. Esse é reduzido a ácido meváldico e mevalônico. O ácido mevalônico é, então, fosforilado e descaboxilado, originando o isopentenil-difosfato (IPP) e seu isômero dimetilalil-difosfato (DMAPP), dos quais derivam as diferentes formas de terpenos (DEWICK, 2009).

Figura 6- Biossíntese dos terpenos pela via do mevalonato. (Continua)

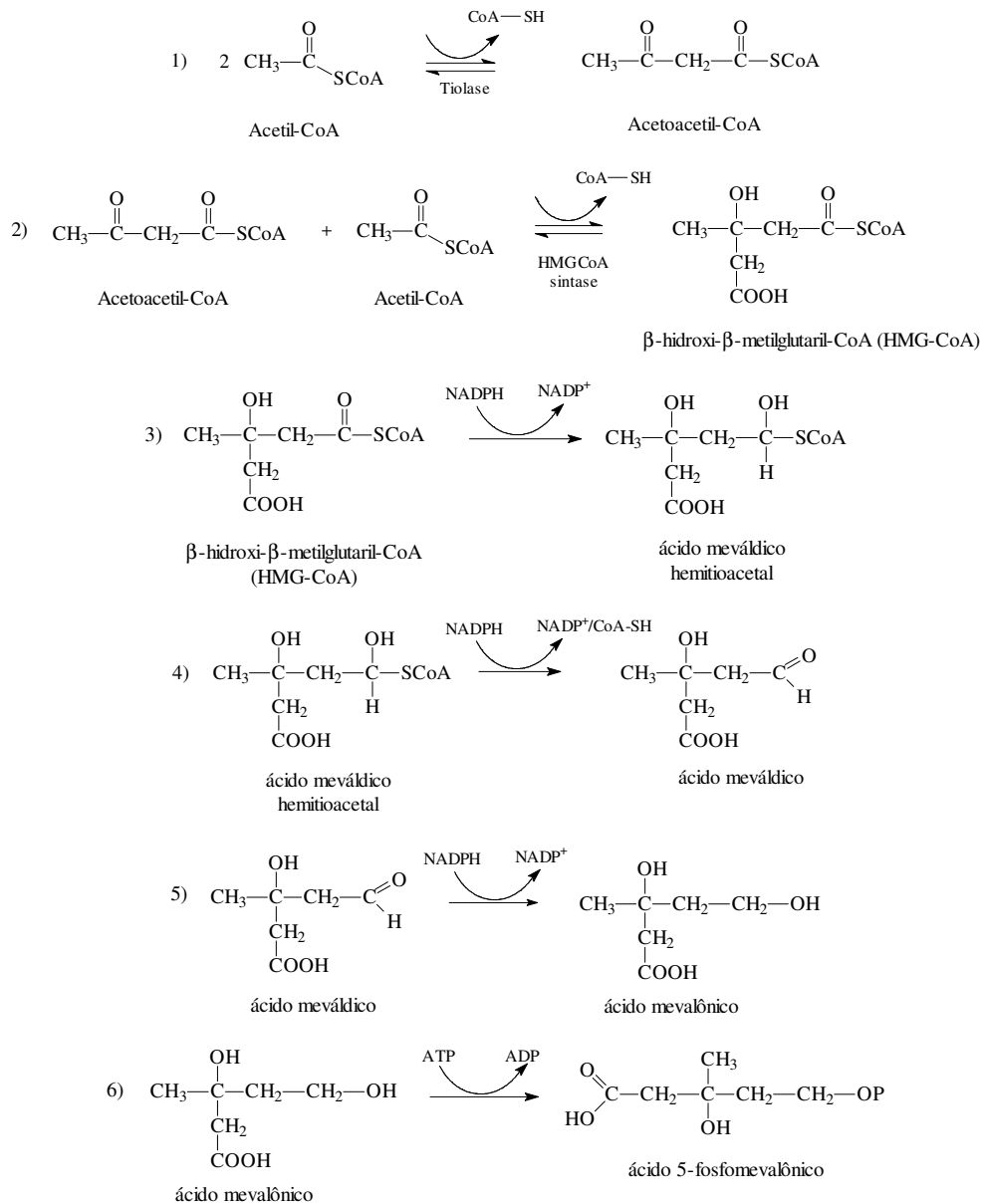


Figura 6- Biossíntese dos terpenos pela via do mevalonato. (Continua)

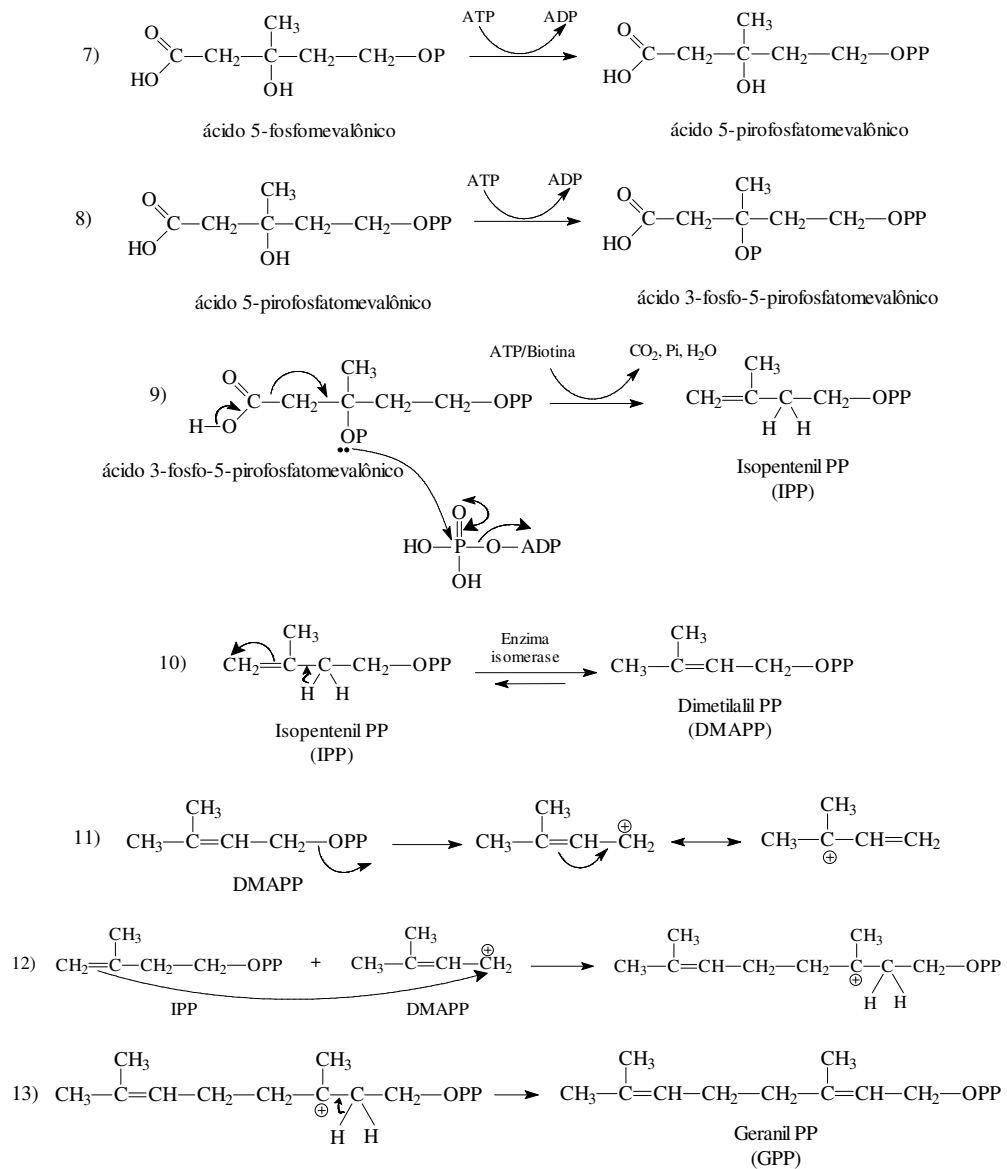
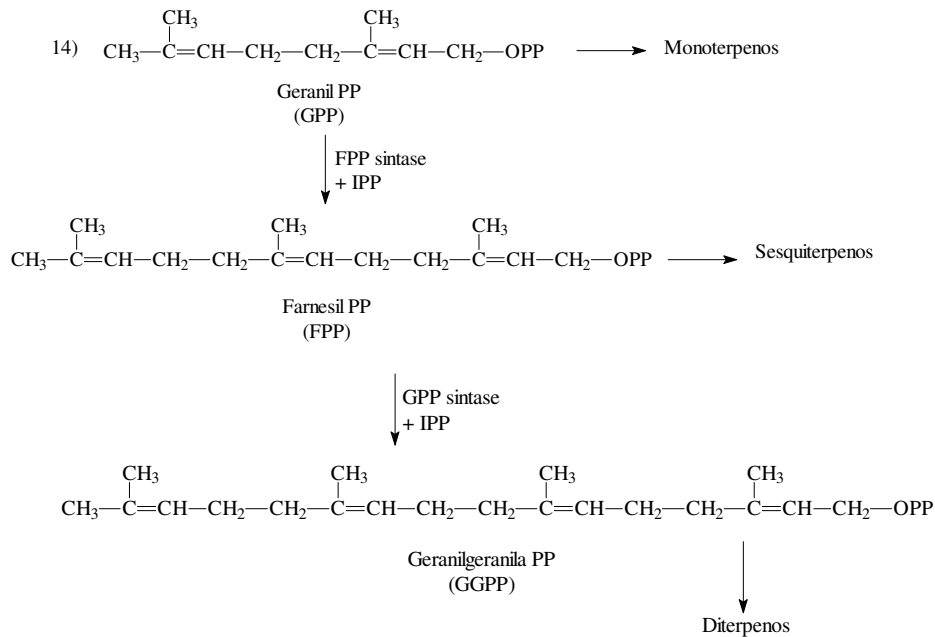


Figura 6- Biossíntese dos terpenos pela via do mevalonato. (Conclusão)



Fonte: Teixeira (2016).

Já a via DXPS (Figura 7) inicia-se com a condensação de piruvato e gliceraldeído-3-fosfato. O DXPS é, então, reduzido a 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato, convertido a um derivado de citidina difosfato e fosforilado via ATP. O composto resultante é, então, convertido em um fosfato cíclico, liberando a molécula de citidina fosfato (CMP). A 4-hidroxi-3-metilbut-2-enil-difosfato-sintase produz o 4-hidroxi-3-metilbut-2-enilo difosfato, que é então transformado em isopentenil-difosfato e dimetilalil-difosfato, nas proporções de 5:1, respectivamente (DEWICK, 2009).

Figura 7- Biossíntese dos terpenos pela via DXPS. (Continua)

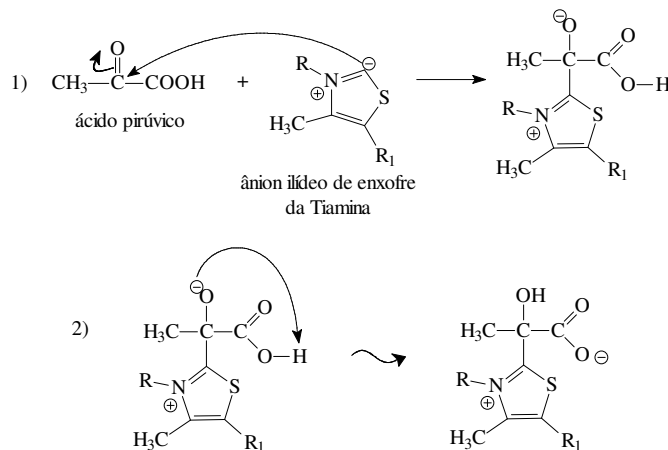


Figura 7- Biossíntese dos terpenos pela via DXPS. (Continua)

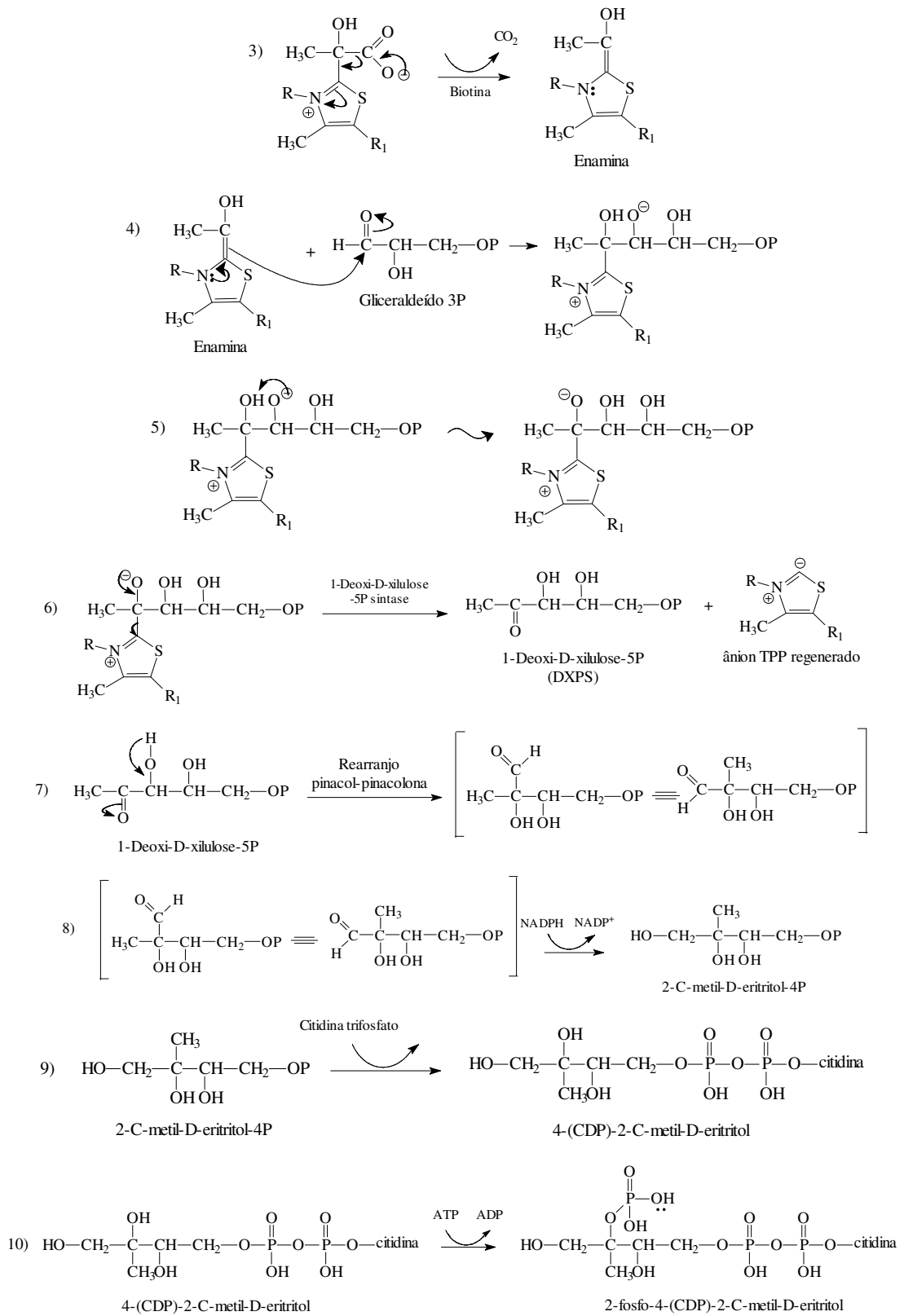
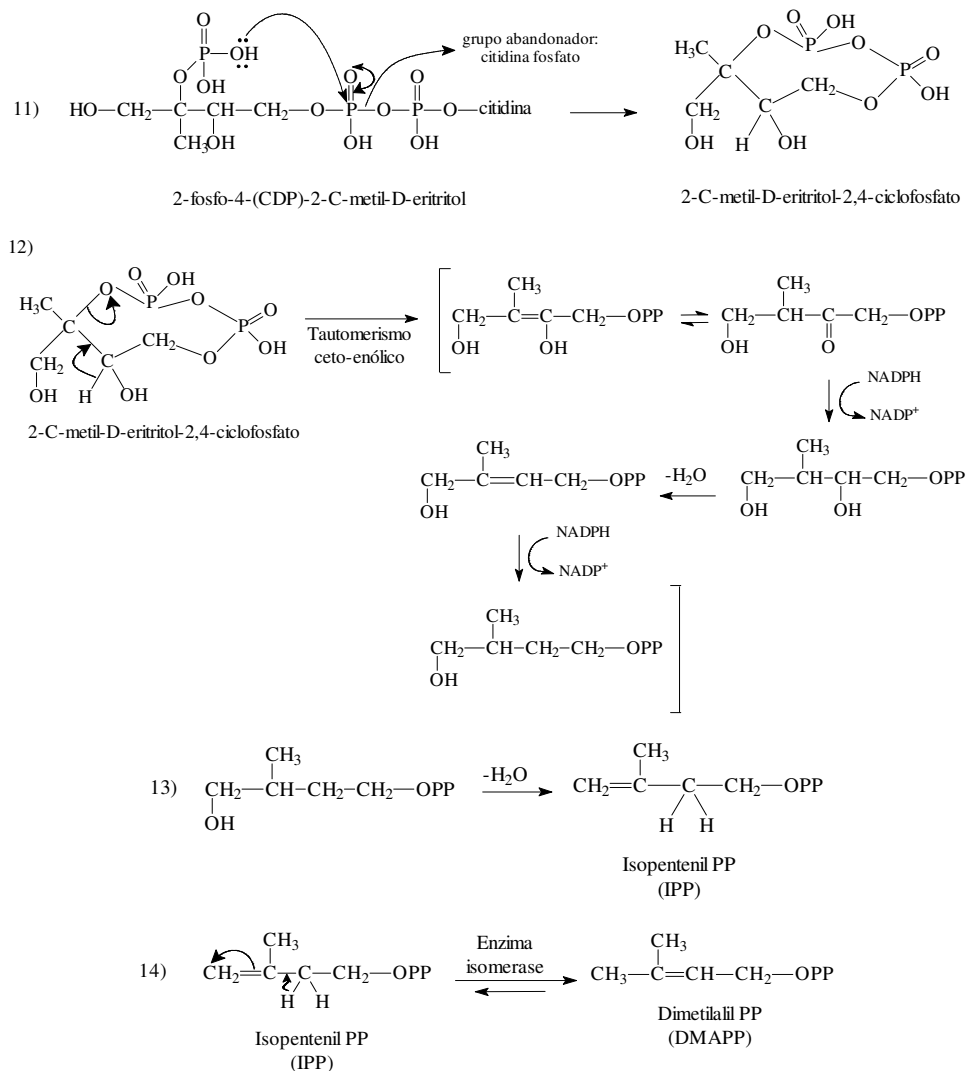


Figura 7- Biossíntese dos terpenos pela via DXPS. (Conclusão)



2.2.2 Atividade antibacteriana dos óleos essenciais e algumas metodologias utilizadas para avaliação

Os constituintes dos óleos essenciais são considerados importantes compostos naturais com propriedades antibacterianas, as quais podem ser verificadas por meio de diversas metodologias.

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2003) os principais testes utilizados para verificar a atividade antibacteriana dos óleos essenciais são os de difusão em ágar e diluição em caldo, sendo esses igualmente aceitáveis para avaliar de forma quantitativa a sensibilidade de microrganismos a quaisquer agentes antimicrobianos.

O método de difusão em ágar é um método físico que consiste na inoculação da substância ativa em meio de cultura sólido, através de disco de papel filtro, cilindros de aço

inoxidável, ou de vidro, ou por meio de perfurações no próprio ágar. Os resultados são avaliados relacionando a proporção da zona de inibição do crescimento bacteriano com as concentrações da substância avaliada. Já o método de diluição em caldo é baseado na inoculação direta do microrganismo e do composto antimicrobiano em meio de cultura líquido, relacionando a proporção de crescimento bacteriano, avaliado pela medida de turbidez do meio de cultura, e as concentrações de agente antimicrobiano testadas. Esse pode ser de dois tipos, macrodiluição, realizado em tubos de ensaio com volume total de meio de cultura variando de 1 a 10 mL, e microdiluição, utilizando microplacas com 96 poços e com volume entre 0,1 e 0,2 mL (OSTROSKY et al., 2008).

Tanto nos testes de difusão em ágar quanto nos de diluição em caldo, a menor concentração de antimicrobiano capaz de causar a inibição do crescimento bacteriano é definida como a Concentração Mínima Inibitória (CMI), ao passo que a concentração responsável pela eliminação das cepas bacterianas é definida como a Concentração Mínima Bactericida (CMB) (Brasil, 2003).

Silva et al. (2015), utilizando a metodologia de difusão em cavidade ágar, verificaram a atividade antibacteriana de óleos essenciais extraídos das espécies de *Mentha viridis* e *Mentha pulegium* sobre cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella Choleraesuis*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. As CMIs para as bactérias Gram-negativas foram as mesmas para os dois óleos, sendo de 62,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ para *E. coli* e 31,3 $\mu\text{L mL}^{-1}$ para *S. Choleraesuis*. Dentre as bactérias Gram-positivas, o óleo essencial de *M. pulegium* mostrou-se mais eficiente, apresentando CMI de 15,6 $\mu\text{L mL}^{-1}$ para *S. aureus* e de 62,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ para *L. monocytogenes*. As CMIs encontradas para o óleo essencial de *M. viridis* foram de 62,5 e 125 $\mu\text{L mL}^{-1}$ para *S. aureus* e *L. monocytogenes*, respectivamente.

Miranda et al. (2016) estudaram a inibição dessas mesmas bactérias pelos óleos essenciais de *Coniza bonariensis*, *Tithonia diversifolia*, *Hedychium coronarium* e *Baccharis dracunculifolia*. Os autores verificaram que o óleo essencial de *C. bonariensis* foi o mais efetivo, apresentando CMIs de 3,9, 15,6 e 500,0 $\mu\text{L mL}^{-1}$ para *S. Choleraesuis*, *S. aureus* e *L. monocytogenes*, respectivamente.

A ação antimicrobiana do óleo essencial de *Origanum vulgare* (orégano) foi verificada por De Araujo e Longo (2016). Os autores avaliaram o potencial bacteriostático e bactericida do óleo essencial de orégano por meio dos métodos de microdiluição e macrodiluição, determinando a Concentração Mínima Inibitória (CMI) e a Concentração Mínima Bactericida (CMB), respectivamente. Os microrganismos avaliados foram duas cepas padrão de *E. coli* e *S. aureus*, e duas cepas isoladas de amostras de pacientes infectados por esses mesmos patógenos.

A CMI e a CMB para a cepa de *E. coli* padrão foram de 6,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$ e 12,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$, respectivamente. Já para a *E. coli* isolada de amostra clínica, a CMI foi de 12,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ e a CMB de 25,0 $\mu\text{L mL}^{-1}$. A cepa de *S. aureus* padrão apresentou CMI e CMB de 12,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$, e a cepa obtida de amostra clínica indicou valores de CMI e CMB de 6,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$ e 25,0 $\mu\text{L mL}^{-1}$, respectivamente.

Outra espécie estudada recentemente é a *Amomum tsaoko*, uma especiaria chinesa cujo o óleo essencial foi citado por Guo et al. (2017) como um potente agente antibacteriano natural. Os autores, por meio de métodos de diluição em caldo, encontraram valores de CMI e CMB entre 3,13 e 12,5 mg mL^{-1} , tanto para as bactérias Gram positivas (*S. aureus*, *Bacillus subtilis*) quanto para as Gram negativas (*E. coli* e *Salmonella typhimurium*).

2.2.3 Mecanismo de ação antibacteriana dos óleos essenciais

É importante saber a maneira como o óleo essencial interage com o patógeno, permitindo, dessa forma, prever qual alvo celular será afetado e qual a influência na sobrevivência do microrganismo nos alimentos, em tecidos vivos ou em como o processo de infecção pode ser contornado (FALEIRO, 2011).

Diversos estudos relatam que a propriedade antibacteriana dos óleos essenciais pode estar associada à sua lipofílicidade, permitindo sua penetração na parede celular e na membrana bacteriana, promovendo uma perturbação nas atividades celulares e causando a liberação de constituintes celulares essenciais à sua sobrevivência. (CAILLET et al., 2009; DE SOUZA et al., 2010; GUO et al., 2017; MIRANDA et al., 2016; PATRA; DAS; BAEK, 2015; TEIXEIRA et al., 2012; YANG KHAN; KANG 2015).

Caillet et al. (2009) atribuíram a ação do óleo essencial de orégano sobre a estrutura da parede celular de *S. aureus*, analisando eletromicrografias obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). Além disso, os autores observaram uma diminuição nos níveis de ATP intracelular e um aumento de ATP extracelular após o tratamento das células bacterianas com o óleo essencial estudado.

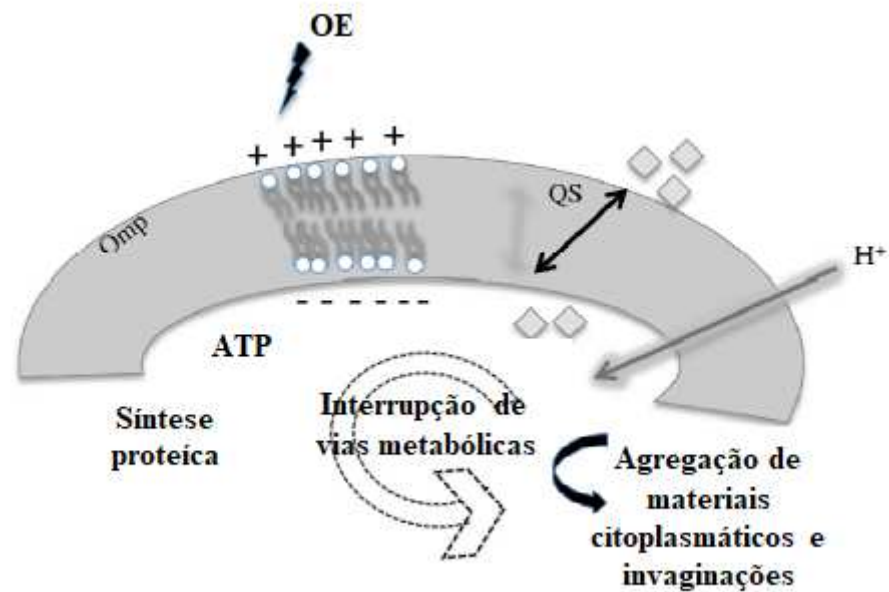
O óleo essencial de *Origanum vulgare* L., estudado por De Souza et al. (2010), promoveu a perda de materiais celulares e íons potássio imediatamente após o contato do óleo essencial com *S. aureus*, indicando a perturbação da integridade da membrana bacteriana. Outra ação observada pelos autores foi a inibição total de enterotoxina, indicando também uma ação indireta do óleo essencial na membrana celular.

Yang; Khan e Kang (2015) estudaram o mecanismo de ação do óleo essencial de *Forsythia koreana* sobre as bactérias *E. coli* e *L. monocytogenes*. Por meio de imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), os autores observaram alterações morfológicas em ambas as bactérias. Além disso, os estudos mostraram que houve um vazamento de íons de potássio para fora da célula, e também liberação de materiais citoplasmáticos, indicando que o óleo essencial atuou sobre a integridade da membrana citoplasmática.

Corroborando com a hipótese de que os óleos essenciais induzem um efeito antibacteriano via interação com a membrana citoplasmática, Patra; Das e Baek (2015) também verificaram efluxo de íons potássio, liberação de ácidos nucleicos e um aumento na condutividade elétrica de cepas de *E. coli* tratadas com o óleo essencial de *Enteromorpha linza*. Os autores também observaram alterações morfológicas, tais como superfície rugosa e alongamento das células. O óleo essencial em estudo comprometeu a capacidade osmorregulatória da bactéria na presença de concentrações elevadas de sal, indicando também a degradação de enzimas importantes dentro da célula bacteriana.

No entanto, devido à complexa composição química dos óleos essenciais, a inibição de microrganismos pode envolver inúmeros mecanismos, uma vez que todos os componentes da célula bacteriana podem se tornar suscetíveis à atuação desses óleos. Além disso, uma estrutura celular afetada pode promover a perturbação de outro componente celular, desencadeando um efeito dominó. De acordo com Faleiro (2011), os óleos essenciais podem interromper processos como a síntese de proteínas e de moléculas de sinalização (QS), alterar a permeabilidade celular, interromper vias metabólicas, provocar desequilíbrio nas taxas de ATPs e promover invaginações e agregação de materiais citoplasmáticos (Figura 8).

Figura 8- Esquema dos possíveis alvos celulares bacterianos afetados pelos óleos essenciais.



Fonte: Adaptado de: Faleiro (2011).

Becerril et al. (2007), analisando imagens de MET, perceberam anomalias intracitoplasmáticas em cepas de *E. coli* e *S. aureus* tratadas com os óleos essenciais de orégano e canela. Essas anomalias foram mais pronunciadas para *E. coli*, dentre as quais foram observadas material coagulado na parede celular e nas extremidades apicais, aumento e irregularidade no espaço periplásmico e ausência de fimbrias.

Estudos realizados por Di Pascua et al. (2010) mostraram a influência do componente timol, constituinte majoritário do óleo essencial de orégano, na síntese proteica de *Salmonella enterica* ser. Thompson. Os autores destacaram alterações nas diversas vias metabólicas, incluindo no metabolismo do citrato e na síntese de ATP, provocadas pelo comprometimento de proteínas envolvidas nessas vias.

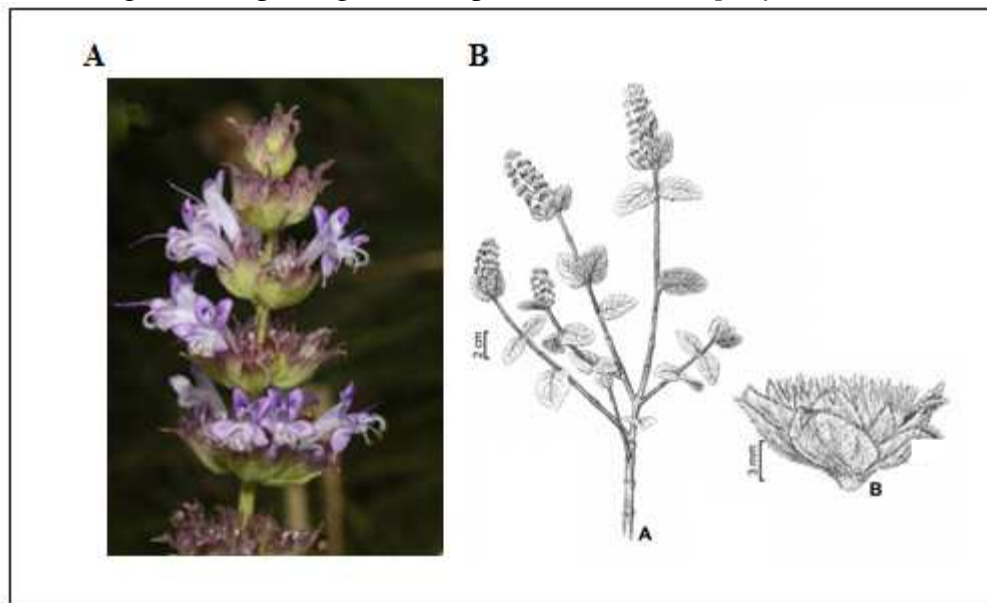
2.3 *Cantinoa carpinifolia* Benth. (rosmaninho)

Cantinoa carpinifolia Benth. (= *Hyptis carpinifolia* Benth.) (Figura 9a), conhecida popularmente como rosmaninho ou rasmaninho, é um arbusto ramificado pertencente à família Lamiaceae, apresentando características odoríferas e inflorescências de cor lilás. A espécie é descrita por Da Silva-Luz et al. (2012), apresentando-se com até 2 m de altura, possuindo folhas sésseis, ovais e coriáceas, com comprimento que varia de 1,9 a 3,1 cm e largura entre 1,2 e 2,0

cm. As flores, também sésseis, possuem bractéolas involucrais, lanceoladas ou ovais, de 5 a 7 mm de comprimento e 1,6 a 3 mm de largura, com ápice acuminado ou agudo (Figura 9b).

No Brasil, é distribuída em áreas de cerrado das Regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste. É uma planta utilizada na medicina popular, no tratamento de doenças, como gripes, resfriados e reumatismo. Suas folhas são geralmente submetidas à infusão e compressas (DA SILVA-LUZ et al., 2012; SILVA; MOURA, 2011).

Figura 9- Aspecto geral da espécie *Cantinoa carpinifolia* Benth



Fonte: Da Silva-Luz et al. (2012); Harley e Pastore (2012).

2.4 Doenças Transmitidas por Alimentos

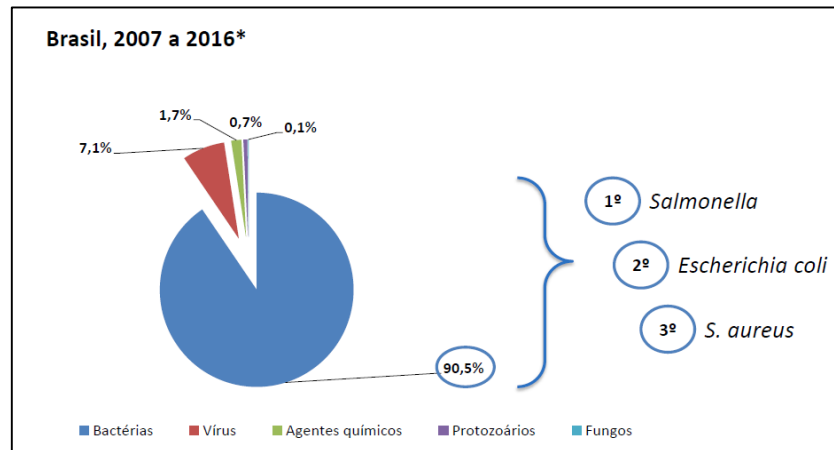
As Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) representam um grave problema de saúde pública. São caracterizadas por geralmente apresentarem um quadro de anorexia, náuseas e diarreia, ocasionado pela ingestão de alimentos ou água contaminados (BRASIL, 2017a).

Os contaminantes de alimentos podem ser divididos em químicos (pesticidas, detergentes e antibióticos), físicos (fragmentos de insetos, pedaços de vidro e poeira) e biológicos (bactérias, vírus e fungos). Ambas as classes afetam a saúde pública; no entanto, os contaminantes biológicos são os mais preocupantes (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

De acordo com o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), entre os anos de 2007 e 2016 as principais contaminações de alimentos no Brasil estavam relacionadas a microrganismos, sendo as bactérias responsáveis por 90,5% dos casos. Dentre os principais patógenos as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, juntamente com a *Salmonella*

ssp, foram as responsáveis pelos maiores números de contaminações (Figura 10) (BRASIL, 2016).

Figura 10- Principais microrganismos associados à contaminação de alimentos no Brasil, entre os anos de 2007 e 2016.



Fonte: Brasil, 2016.

Já foram relatados mais de 250 tipos DTA, apresentando sintomas clínicos que podem variar conforme o agente de infecção, desde casos passageiros de disenteria, até quadros críticos de desidratação, diarreia sanguinolenta e problemas renais (BRASIL, 2017a).

Essas enfermidades são responsáveis por considerável morbidade e mortalidade. Segundo estimativas realizadas pela Organização Mundial de Saúde, uma em cada dez pessoas adoece anualmente pela ingestão de alimentos contaminados, representando cerca de 600 milhões de pessoas. Os casos de óbito contabilizam 420 mil indivíduos, dos quais, cerca de 1/3 são crianças menores de 5 anos. As áreas de baixa renda respondem pelos maiores números de casos, destacando-se a África e o sudeste asiático (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015).

No Brasil, nos anos entre 2007 e 2016, houve cerca de 6.632 surtos, envolvendo 118.102 doentes, sendo relatados 109 casos de óbito. As principais regiões relatadas foram Sudeste e Sul, respondendo por 43,8 e 24,8% dos casos, respectivamente. No entanto, sabe-se que nessas áreas os Sistemas de Vigilância Sanitária e Epidemiológica já se encontram bem instalados, levando-nos a questionar sobre a eficiência no levantamento desses dados (BRASIL, 2016).

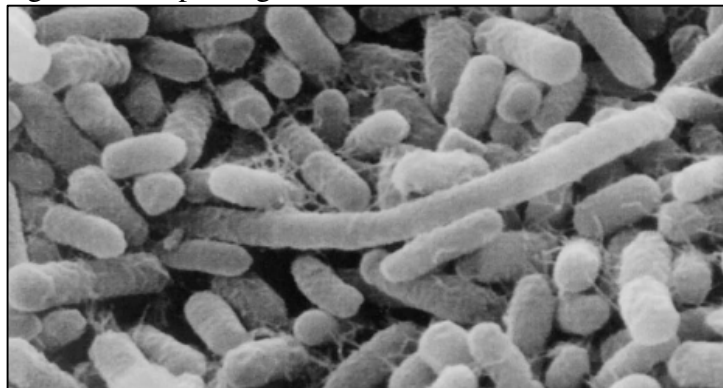
2.5 Principais bactérias de origem alimentar

2.5.1 *Salmonella* sp

Responsáveis pelos maiores números de surtos alimentares em diversos países, o gênero *Salmonella* (Figura 11) compreende bactérias do tipo bacilos Gram-negativos. As contaminações ocorrem pela ingestão de alimentos contaminados, como leite, ovos, carne bovina e de aves (SHINOHARA et al., 2008).

As doenças causadas por esse gênero podem ser divididas em três grupos: febre tifoide, entérica e enterocolite (ou salmoneloses), cada qual com sintomas próprios. A febre tifoide afeta apenas o homem, manifestando-se por meio de septicemia, febre alta, diarreia e vômitos, podendo levar a óbito. O indivíduo contaminado pode se tornar um portador por muito tempo, mesmo após a desintoxicação, apresentando-se como fonte de contaminação de águas e alimentos. A febre entérica caracteriza-se por sintomas mais brandos que a tifoide, porém com um tempo de duração mais curto. Ambas são tratadas mediante os antibióticos cloranfenicol ou ampicilina. Já nos casos de salmoneloses, geralmente não é necessário o tratamento com antibiótico. Os sintomas clínicos são diarreias, febres, dores abdominais e vômitos, com duração que varia entre um a quatro dias. Nos animais, os sintomas são bastante semelhantes, sendo os gado, suínos e aves as espécies mais susceptíveis à contaminação (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Figura 11- Aspecto geral da bactéria *Salmonella enterica*.

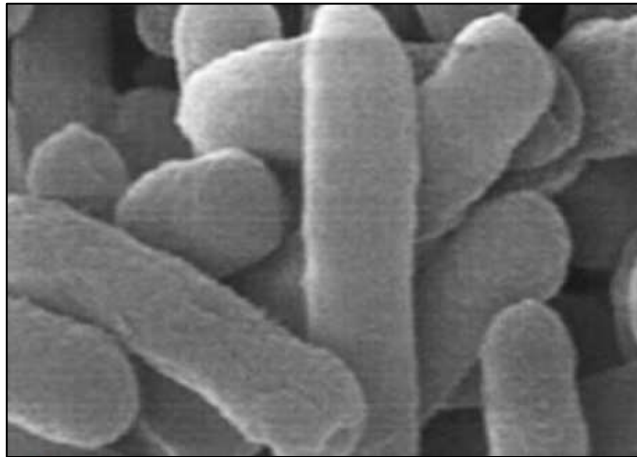


Fonte: Gupte; De Rezende e Joseph, 2003.

2.5.2 *E. coli*

É uma bactéria bacilo Gram-negativo (Figura 12), pertencente à família Enterobacteriaceae. Apresenta-se na forma de bastonete curto, não esporulado, com tamanho que varia de 1,1 a 1,5 µm por 2,0 a 6,0 µm. Possui metabolismo anaeróbio facultativo, e a maioria são móveis devido à presença de flagelos peritríquios (FERREIRA; KNÖBL, 2009).

Figura 12- Aspecto geral da bactéria *Escherichia coli*.



Fonte: Bajpai et al. (2017)

Quando em meios de nutrientes sólidos, as unidades formadoras de colônias (UFC) podem se apresentar com aspecto rugoso ou liso, com diâmetro de 1 a 3 mm, havendo também colônias intermediárias (FERREIRA; KNÖBL, 2009).

É uma bactéria de origem fecal e sua presença nos alimentos indica más condições de higiene. Pode ser isolada através do trato gastrointestinal de humanos e animais (domésticos e selvagens). Esses microrganismos sobrevivem na faixa de pH entre 5 e 9 e apresentam temperatura ótima de crescimento em torno de 37 °C (BAKER et al., 2016).

As linhagens patogênicas de *E. coli* podem ser divididas em cinco classes: enteropatogênica (EPEC), enteroinvasora (EIEC), enterotoxigênica (ETEC), enterohemorrágica (EHEC) e enteroagregativa (EAGGEC), todas relacionadas a casos de diarreia, com virulência variando conforme a classe (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

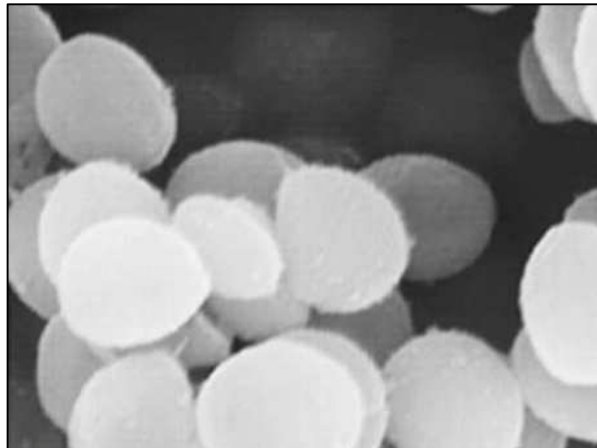
As infecções por enteropatogênica clássica são as principais causadoras de gastroenterite em crianças, caracterizando-se por diarreia, dores abdominais, vômitos e febre. A doença apresenta um período de incubação entre um intervalo de 17 e 72 horas (média de 36 horas). As enteroinvasoras provocam a eliminação de sangue e muco com as fezes, cólicas abdominais, febre e mal-estar, manifestando-se após um período de, em média, 11 horas. As *E. coli*

pertencentes à classe enterotoxigênica possuem um período de incubação de 8 a 44 horas, provocando febre baixa, dores abdominais e náuseas, caracterizando-se por diarreia aquosa. As contaminações do tipo entero-hemorrágica manifestam-se por dores abdominais severas e diarreia aguda, seguida de diarreia sanguinolenta, diferindo-se das demais pela ausência de febre. O período de incubação varia de três a nove dias. Por fim, sobre as *E. coli* enteroagregativas, ainda não foram relatados surtos de origem alimentar, mas, também, parecem estar associadas com casos crônicos de diarreia (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

2.5.3 *S. aureus*

É uma bactéria pertencente à família Micrococcaceae, do tipo cocos Gram-positivo (Figura 13). Possui metabolismo anaeróbico facultativo, são imóveis e suas células crescem em grumos, semelhante a cachos de uvas. As unidades formadoras de colônias (UFC) de *S. aureus* mostram-se arredondadas, lisas e brilhantes, sendo capazes de crescer em meios de cultura sólidos ou líquidos. Sua temperatura ótima de crescimento varia entre 35 e 37 °C (KONEMAN et al., 2008).

Figura 13- Aspecto geral da bactéria *Staphylococcus aureus*.



Fonte: Bajpai et al. (2017)

As intoxicações são provocadas por alimentos que apresentam enterotoxinas (toxinas produzidas por *S. aureus*), causando sintomas que variam de acordo com a concentração dessa toxina, quantidade ingerida do alimento e sensibilidade do indivíduo. As principais ocorrências são náuseas, vômitos, câibras abdominais, diarreias e sudorese. Em alguns casos, podem haver, ainda, dores de cabeça, calafrios, queda de pressão arterial e, em quantidades elevadas de toxina, febres (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

2.6 Antimicrobianos sintéticos

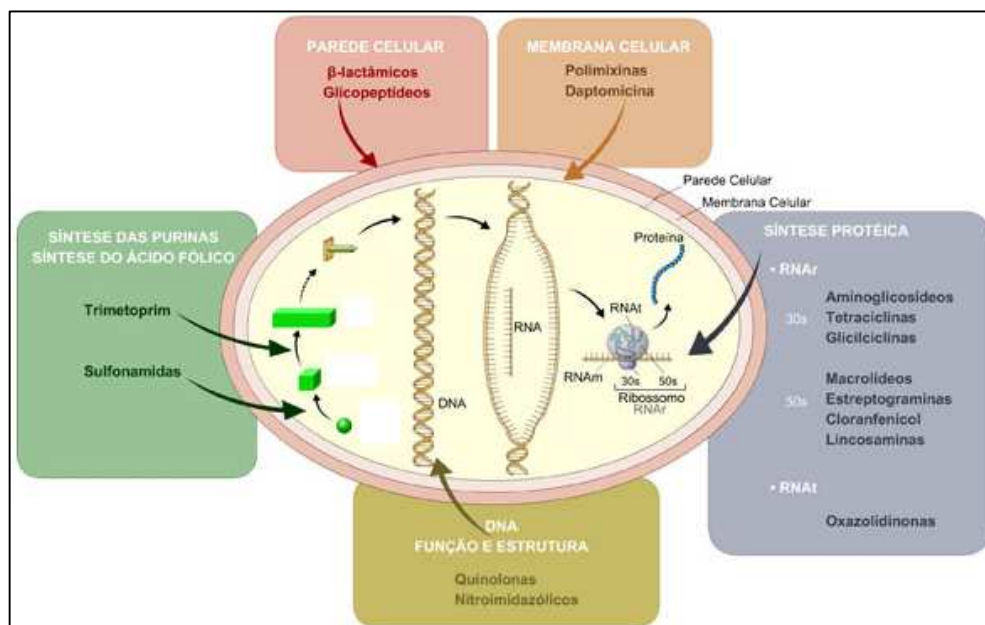
Tanto na indústria alimentícia, como no tratamento terapêutico de pessoas diagnosticadas com DTA, os antimicrobianos sintéticos representam a principal ferramenta de controle desses microrganismos.

Para que seja eficiente, esses produtos devem ser capazes de permear a parede celular bacteriana, possuir afinidade pelo sítio de ligação, manter-se tempo suficiente para promover a inibição e permanecer na sua concentração ideal no local infectado (BRASIL, 2017b).

Eles podem ser classificados como bactericidas, quando são capazes de inativar e destruir as células bacterianas, e como bacteriostáticos, atuam na inibição da multiplicação do microrganismo.

Podem agir inibindo a síntese da parede celular (penicilina, cefalosporina), ao nível da membrana citoplasmática, promovendo sua desorganização e ruptura, bem como alterando sua permeabilidade (colistina, daptomicina), ao nível de substrato, influenciando na síntese proteica e nas funções e estrutura do DNA (cloranfenicol, levofloxacina) ou nas vias metabólicas intermediárias (sulfametoxazol, sulfanilamida) (Figura 14) (BRASIL, 2017b).

Figura 14- Esquema geral dos mecanismos de ação de alguns antibióticos sintéticos.



Fonte: Adaptado de Brasil (2017)b.

No entanto, o uso indiscriminado desses produtos pode selecionar cepas bacterianas resistentes, bem como promover efeitos adversos. Além disso, esses produtos, quando usados de forma irregular, podem estar associados a danos à saúde do homem e ao meio ambiente,

surgindo, assim, a necessidade de sua substituição e/ou associação com produtos naturais que sejam menos agressivos e ecologicamente seguros.

Dessa forma, objetivou-se no presente estudo extrair e caracterizar quimicamente o óleo essencial de *C. carpinifolia* Benth., avaliar seu potencial antibacteriano e elucidar seu mecanismo de ação sobre as bactérias *E. coli* e *S. aureus*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção do material vegetal e extração do óleo essencial de *C. carpinifolia*

As folhas de *C. carpinifolia* foram coletadas no município de Itumirim-MG, em 6 de fevereiro de 2014, no período da manhã de um dia ausente de chuva. A identificação da espécie vegetal foi realizada pela professora doutora Mariana Esteves Mansandres, do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras e a exsicata foi depositada no Herbário ESAL, sob o registro de numeração 28.489.

A extração do óleo essencial foi realizada no Laboratório de Química Orgânica - Óleos Essenciais/ DQI, da UFLA, pela técnica de hidrodestilação utilizando um aparelho de Clevenger modificado, por 2 horas. O hidrolato foi submetido à centrifugação a 965 g por 10 minutos. Posteriormente, o óleo essencial foi pipetado com o auxílio de uma micropipeta de Pasteur e acondicionado em um vidro âmbar sob refrigeração (BRASIL, 2010).

3.2 Caracterização química do óleo essencial de *C. carpinifolia*

A análise química do óleo essencial foi realizada na Central de Análise e Prospecção Química (CAPQ) do Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras.

Os compostos químicos foram identificados por cromatografia gás-líquido acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), utilizando um aparelho Shimadzu, modelo QP 5050A, nas seguintes 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 foi o hélio, o fluxo de saída 1,0 mL min⁻¹; o volume da amostra injetada foi de 0,1 µL, diluída em hexano; a taxa de partição do volume injetado foi de 1:20 e pressão na coluna de 71,0 kPa; A temperatura do forno foi programada para 60 °C, 1 min, aumentando até 246 °C (3°C min⁻¹), depois a 10 °C até atingir 300 °C, mantendo-se constante essa temperatura por 7 min; A temperatura do injetador e detector foram de 220 °C e 240 °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.

Os compostos foram identificados por comparação com as bibliotecas do equipamento, NIST107 e NIST21, sendo a quantificação de cada constituinte obtida por meio de normalização de áreas (%), por meio de um cromatógrafo gasoso Shimadzu CG-17A equipado com detector por ionização de chamas (DIC), nas mesmas condições experimentais usadas para identificação dos constituintes do óleo essencial.

O índice de retenção foi calculado empregando-se a equação de Van den Dool e Kratz (1963) (Equação 1) em relação à série homóloga de n-alcenos (nC₈-nC₁₈).

$$IR = 100n + \frac{100 tR(i) - tR(n)}{tR(n + 1) - tR(n)} \quad (1)$$

Em que:

tR = o tempo de retenção do composto avaliado,

i = composto avaliado,

n = número de carbonos do padrão antecessor ao composto avaliado e

n + 1 = número de carbonos do padrão sucessor ao composto avaliado.

3.3 Determinação da atividade antibacteriana do óleo essencial de *C. carpinifolia*

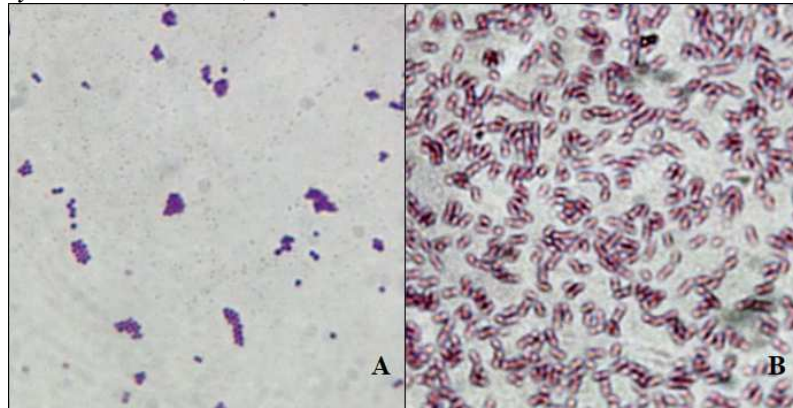
Os testes foram realizados no Laboratório de Micotoxina e Micologia de Alimentos (DCA) da Universidade Federal de Lavras, sob a orientação do professor Luís Roberto Batista.

Os microrganismos estudados foram as bactérias *Escherichia coli* EPEP- 055 e *Staphylococcus aureus* ATCC-13565.

3.3.1 Cepas bacterianas

As bactérias avaliadas foram cedidas pela coleção de cultura de microrganismos do Departamento de Ciências dos Alimentos da UFLA, as quais foram mantidas em eppendorfs contendo meio de congelamento [glicerol (150 mL), peptona (5 g), extrato de levedura (3 g), NaCl (5 g), água (1000 mL), pH 7,2 ± 7,4], sob refrigeração a -4 °C. A pureza das cepas foi confirmada por microscopia, pela técnica de coloração de Gram (Figura 15).

Figura 15- Imagens obtidas por microscopia pela técnica de coloração de Gram. A- *Staphylococcus aureus*; B- *Escherichia coli*.

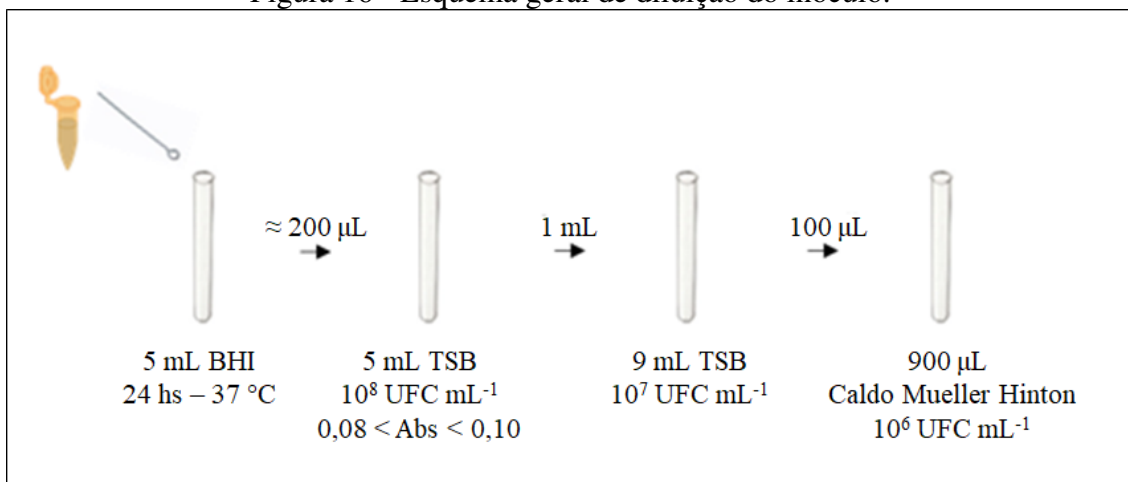


Fonte: Do autor (2017).

A influência do óleo essencial sobre as bactérias em estudo foi avaliada sobre cepas com concentração de 10^6 UFC mL^{-1} . As cepas foram repicadas em 5 mL de BHI (caldo-infusão de cérebro e coração) e incubadas a 37°C por 24 horas, obtendo as “culturas-mãe”. Essas foram diluídas em TSB (caldo de soja triptica), ajustando-se sua turbidez com o auxílio de um espectrofotômetro (Shimadzu UV-160 1 PC) a 625 nm, no intervalo de 0,08 a 0,1, equivalente a turbidez de uma solução-padrão Mc Farland de 0,5, resultado em uma solução de 10^8 UFC mL^{-1} (BRASIL, 2003).

A solução do inóculo obtida pela escala Mc Farland foi novamente diluída em TSB (10^7 UFC mL^{-1}) e, em seguida, em Caldo Mueller Hilton, resultando na concentração de 10^6 UFC mL^{-1} (Figura 16).

Figura 16 - Esquema geral de diluição do inóculo.



Fonte: Do autor (2018).

3.3.2 Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) do óleo essencial de *C. carpinifolia* sobre *E. coli* e *S. aureus*

A concentração mínima inibitória foi determinada pelo método de macrodiluição (Figura 17) (BRASIL, 2003). O óleo essencial foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) e incorporado em eppendorfs contendo caldo Mueller Hinton, totalizando um volume de 900 μL de solução, resultando nas diluições de 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,15, 1,56, 0,78, 0,39 e 0,19 $\mu\text{L mL}^{-1}$.

Posteriormente, adicionaram-se a essas soluções 100 μL do inóculo (10^7 UFC mL^{-1}) e armazenaram-nas a 37 °C por 24 horas.

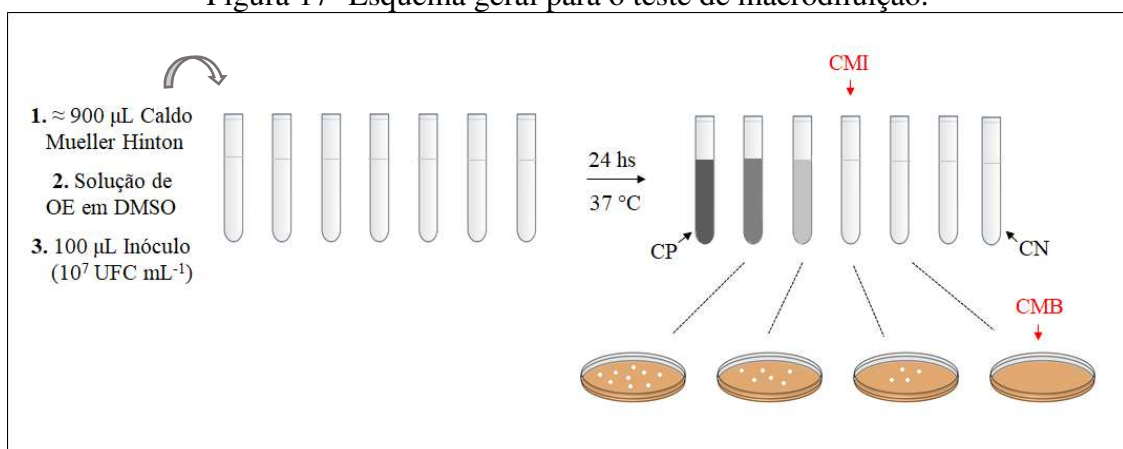
A concentração mínima inibitória foi definida como a menor concentração, que não apresentou, visualmente, crescimento bacteriano, observado pela não turvação da solução após esse período.

A fim de confirmar a inibição do crescimento bacteriano, foram plaqueadas duas concentrações acima e abaixo da CMI.

O plaqueamento foi realizado pelo método de espalhamento em superfície, as placas incubadas a 37 °C e avaliadas após 24 horas. A menor concentração que apresentou ausência completa de crescimento bacteriano na superfície do ágar foi definida como concentração mínima bactericida (CMB).

Como controles, foram preparadas uma solução contendo DMSO, Caldo Mueller Hinton e inóculo e uma solução contendo apenas Caldo Mueller Hinton e inóculo.

Figura 17- Esquema geral para o teste de macrodiluição.



*CP= Controles positivos: 1- Caldo Mueller Hinton + inóculo; 2- DMSO + Caldo Mueller Hinton + inóculo; CN= Controle negativo: Caldo Mueller Hinton. Fonte: Do autor (2018).

3.3.3 Efeito do óleo essencial de *C. carpinifolia* na viabilidade celular bacteriana

O efeito do óleo essencial na viabilidade celular bacteriana foi avaliado de acordo com a metodologia descrita por Patra; Das; Baek (2015) (Figura 18). A concentração de óleo essencial avaliada foi a concentração mínima inibitória.

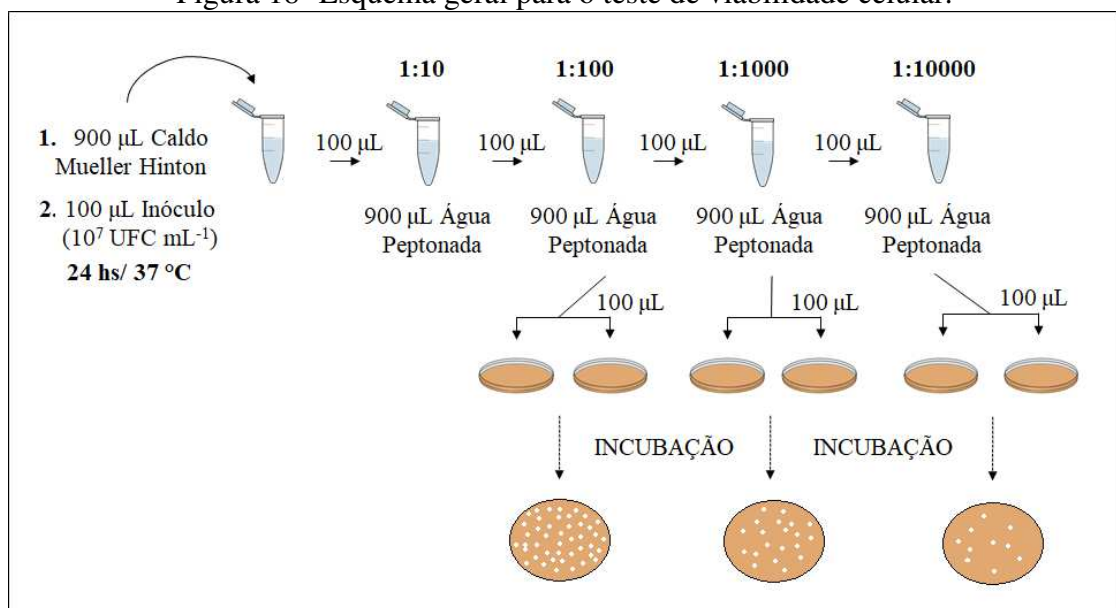
Neste ensaio, o óleo essencial, diluído em DMSO, foi incorporado em caldo Mueller-Hinton, resultando no volume de 900 μL . Posteriormente, foram adicionados a essa solução 100 μL de suspensão bacteriana. Um controle foi preparado apenas com a cultura bacteriana.

Os tubos foram agitados vigorosamente e incubados a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 300 minutos. As amostras foram coletadas (100 μL) em cinco tempos, a cada \pm 60 minutos, diluídas em água peptonada, plaqueadas em meio ágar Mueller-Hinton e incubadas a 37 $^{\circ}\text{C}$.

Após 24 horas, foi determinado o número de unidades formadoras de colônias, expressas em termos do \log_{10} (UFC mL^{-1}).

O experimento foi realizado em triplicata.

Figura 18- Esquema geral para o teste de viabilidade celular.



*Esquema mostrado para o controle contendo apenas a cultura bacteriana. Fonte: Do autor (2018).

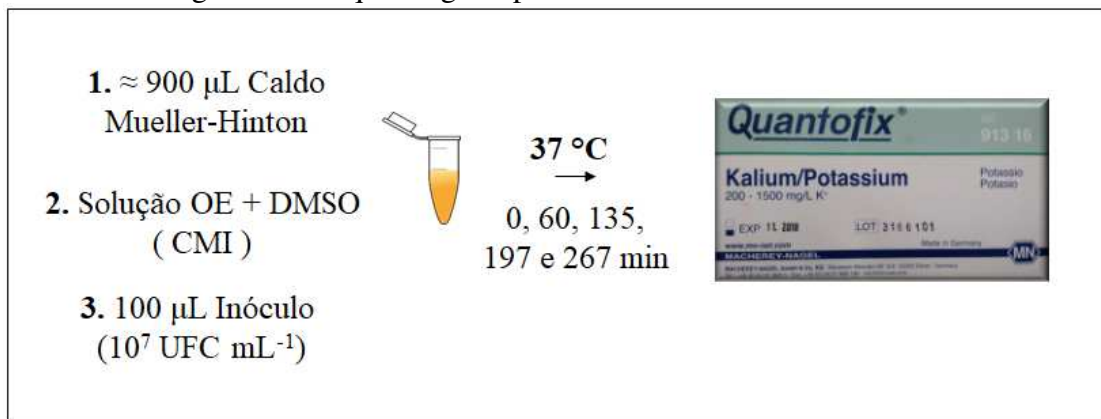
3.3.4 Efeito do óleo essencial de *C. carpinifolia* na liberação de íons potássio

3.3.4.1 Kit Cálcio/Potássio (Quantofix, Macherey-Nagel GmbH & Co., Germany)

A concentração de íons potássio na suspensão bacteriana foi inicialmente determinada utilizando um kit semiquantitativo Cálcio/Potássio (Quantofix, Macherey-Nagel GmbH & Co., Germany), de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante.

Adicionaram-se cerca de 900 μL de Caldo Mueller-Hinton, à solução de óleo essencial em DMSO e 100 μL de suspensão bacteriana, resultando nas CMI obtidas para cada bactéria avaliada. Posteriormente, foram realizadas medições a cada ± 60 minutos de incubação do óleo essencial com a suspensão bacteriana (100 μL). Os resultados foram expressos, como a quantidade de íons K^+ em mg mL^{-1} , a cada intervalo de tempo. Um controle foi avaliado apenas com a suspensão bacteriana e o experimento foi realizado em triplicata (Figura 19).

Figura 19 - Esquema geral para o teste de viabilidade celular.



Fonte: Do autor (2018).

3.3.4.2 Quantificação de íons K^+ por Fotometria de chama

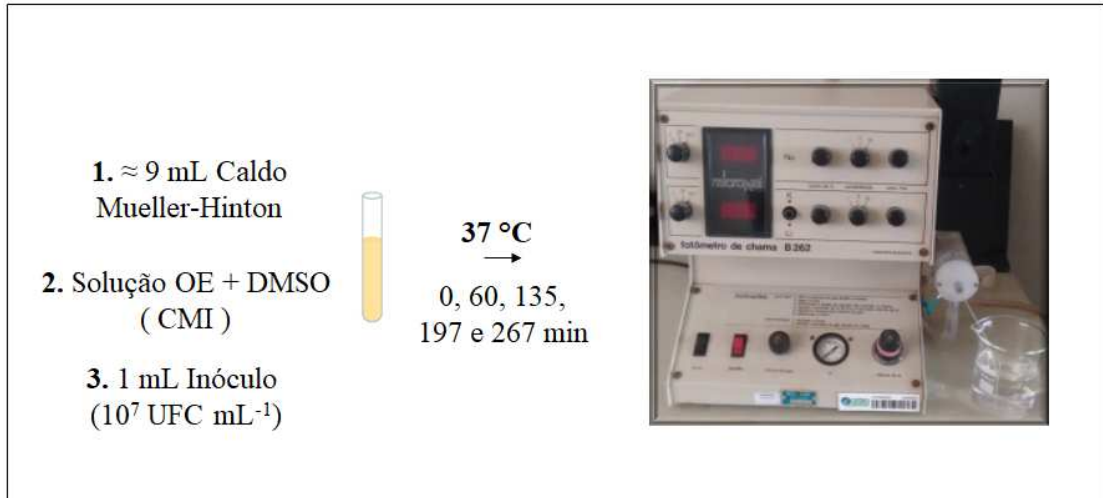
De forma quantitativa, a concentração de íons potássio na suspensão bacteriana foi determinada pelo método de fotometria de chama (Malavolta, 1997) (Figura 20). O experimento foi realizado no Laboratório de Análise Foliar da Universidade Federal de Lavras.

A solução de óleo essencial em DMSO foi adicionada a $\pm 9,0$ mL de Caldo Mueller-Hinton, juntamente com 1,0 mL de suspensão bacteriana, resultando nas CMIs obtidas para *E. coli* e *S. aureus*.

Após 0, 60, 135, 197 e 267 minutos, 0,5 mL de suspensão foi diluída em 2,5 mL de água destilada e 10,0 mL de trabalho de lítio, realizando-se as medições em um fotômetro de chama B 262.

Foi realizada uma suspensão controle, contendo apenas as bactérias em estudo e o meio de cultura. O experimento foi realizado em triplicata e os resultados expressos em mg Kg^{-1} de K^+ a cada intervalo de tempo.

Figura 20- Esquema geral para o teste de liberação de íons potássio, utilizando o método de fotometria de chama.



Fonte: Do autor (2018).

3.3.5 Efeito do óleo essencial de *C. carpinifolia* na liberação de constituintes celulares absorventes a 260 nm

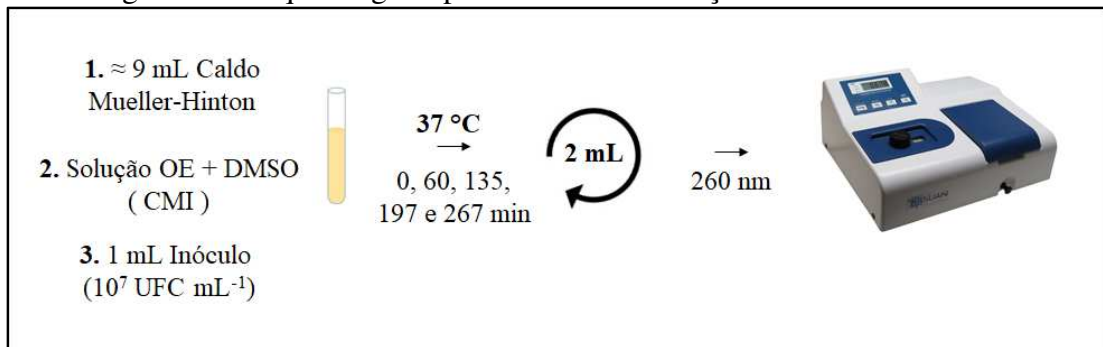
A liberação de constituintes celulares que absorvem a 260 nm foi determinada por meio de leituras de absorbância (YANG; KHAN; KANG, 2015) (Figura 21).

Inicialmente, adicionaram-se cerca de 9,0 mL de Caldo Mueller-Hinton em tubos de ensaio, juntamente com 1,0 mL de suspensão bacteriana e a solução de óleo essencial em DMSO, resultando nas respectivas CMIs determinadas para *E. coli* e *S. aureus*.

Os tubos foram incubados a 37 °C, e a cada ± 60 minutos, foram coletas alíquotas de 2,0 mL, determinando-se a absorbância do sobrenadante por meio de um espectrofotômetro (Shimadzu UV-160-1PC) à 260 nm.

O ensaio foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos em termos de valores de absorbância em relação ao tempo, comparando-os com um controle negativo contendo apenas a suspensão bacteriana.

Figura 21 - Esquema geral para o teste de liberação de ácidos nucleicos.



Fonte: Do autor (2018).

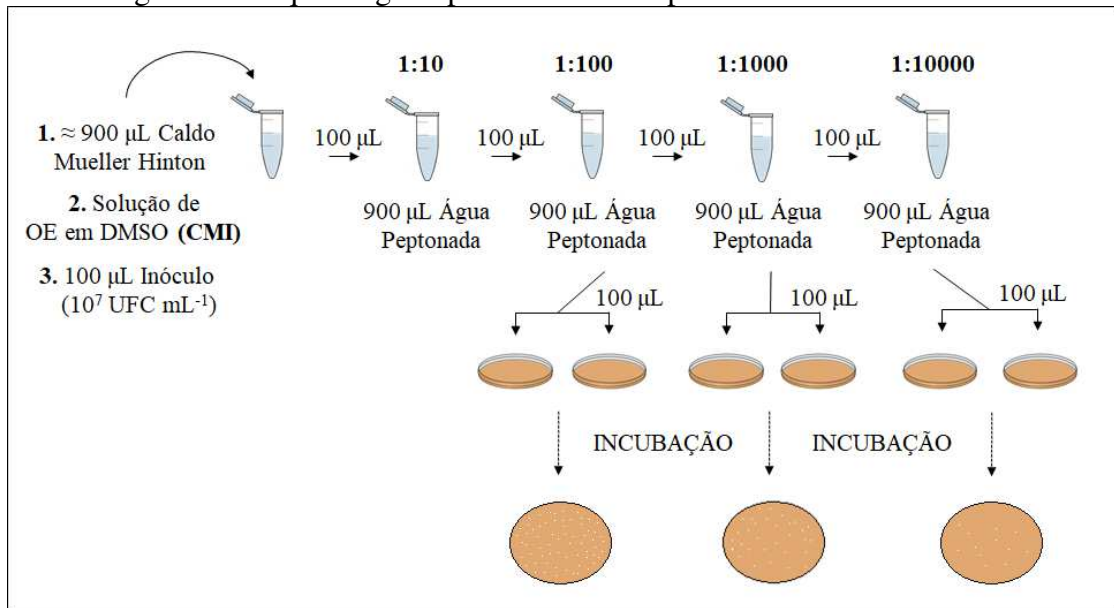
3.3.6 Efeito do óleo essencial de *C. carpinifolia* na capacidade de tolerância a sal

O efeito do óleo essencial na capacidade de tolerância das bactérias na presença de sal foi avaliado de acordo com Patra; Das; Baek (2015) (Figura 22).

A solução de óleo essencial em DMSO foi incorporada em aproximadamente 900 μL de caldo Mueller-Hinton e 100 μL das culturas bacterianas, avaliando-se a CMI determinada para cada cepa em estudo.

As soluções obtidas foram diluídas em água peptonada e, posteriormente, plaqueadas em Ágar Mueller-Hinton (NA), suplementado com NaCl nas concentrações de 0, 2,5 e 5,0 %. Culturas bacterianas puras foram utilizadas como controle. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Após esse período, foi determinado o número de unidades formadoras de colônias.

Figura 22- Esquema geral para o teste de capacidade de tolerância a sal.



*Esquema mostrado para o controle contendo apenas a cultura bacteriana plaqueada em Ágar Mueller-Hinton sem suplementação de NaCl. Fonte: Do autor (2018).

3.3.7 Efeitos morfológicos provocados pelo óleo essencial de *C. carpinifolia* nas bactérias *E. coli* e *S. aureus*

O efeito do óleo essencial na morfologia das bactérias foi avaliado por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural do Departamento de Fitopatologia da UFPA, sob a orientação do Professor Eduardo Alves.

As amostras foram preparadas pela incubação da solução de óleo essencial em DMSO com a suspensão bacteriana (10^7 UFC mL^{-1}) em cerca de $900 \mu\text{L}$ de Caldo Mueller-Hinton, a 37°C , por 24 horas. Foram preparados tubos controles sem a adição de óleo essencial.

Após a incubação, as amostras foram fixadas em solução fixadora Karnovsky modificado (Glutaraldeído 2,5%, formaldeído 2%, tampão cacodilato 0,05 M, pH 7,2 e CaCl_2 0,001 M), por um período mínimo de 24 horas. Posteriormente, foram lavadas com tampão cacodilato pH 7,2, por 2 vezes, 10 minutos, desidratadas pela exposição sequencial a 25, 50, 75 e 90% de acetona, secas em aparelho de ponto crítico (Bal-tec CPD 030) e pulverizadas com ouro (DE OLIVEIRA et al., 2017).

As eletromicrografias foram obtidas após esse processo, pelo exame das amostras em um microscópio eletrônico de varredura (EVO 040 Leo).

3.4 Análise estatística

Para comparar os tempos em relação às variáveis de interesse, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, ao passo que, nas comparações múltiplas, foi utilizado o teste de Nemenyi. Já para a análise entre os grupos, foi utilizado o teste de Mann-Whitney (HOLLANDER; WOLFE, 1999).

O software estatístico utilizado nas análises foi o R (versão 3.4.0).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização química do óleo essencial de *C. carpinifolia*

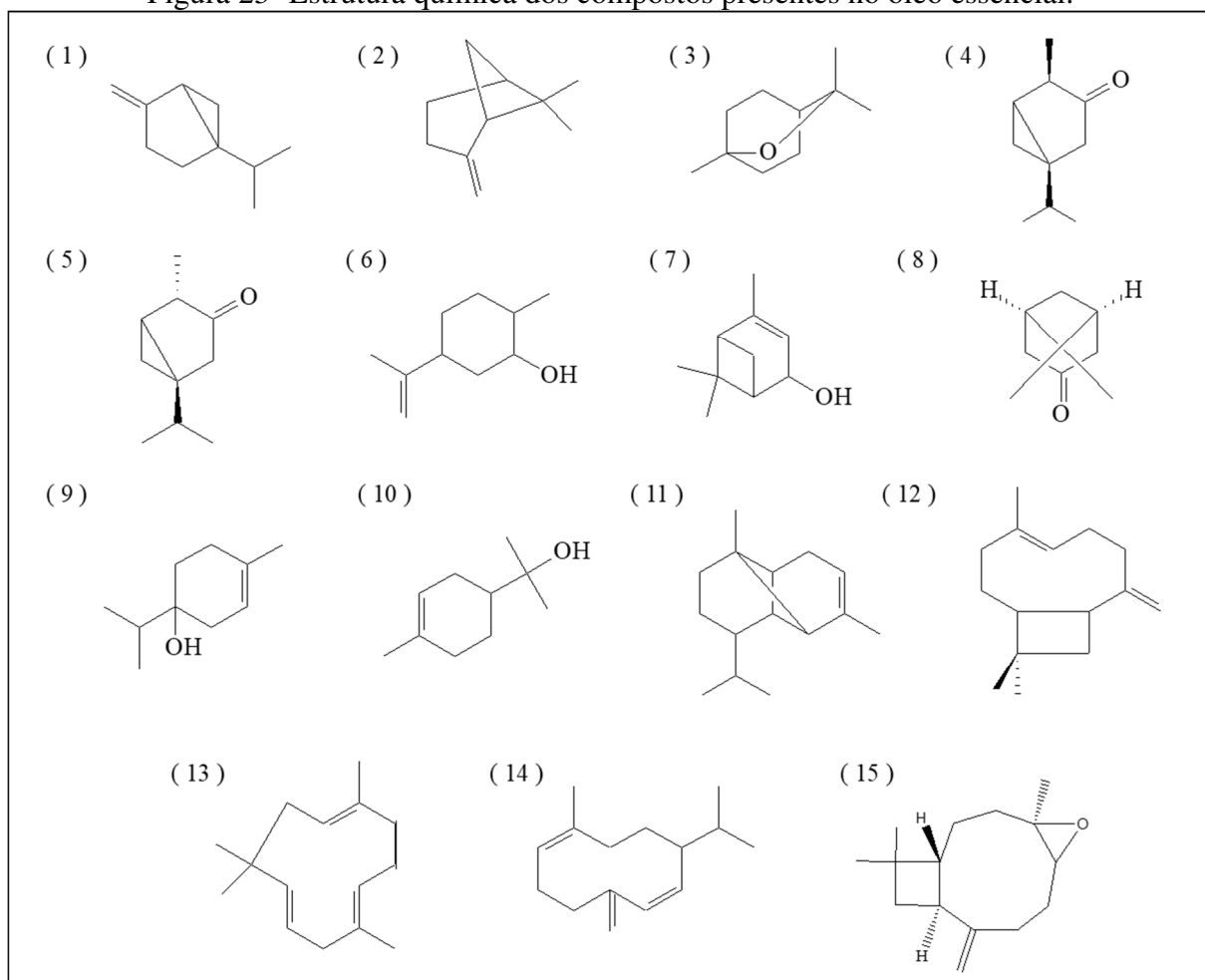
Os compostos identificados no óleo essencial de *C. carpinifolia* estão descritos na Tabela 1. Foram caracterizados 15 constituintes químicos (Figura 23), sendo os majoritários os monoterpenos α - tujona (38,14%), β - tujona (22,43%), sabineno (5,00%) e *cis*- pinocanfeno (5,55%), e o sesquiterpeno β - cariofileno (7,28%).

Tabela 1- Constituição química do óleo essencial extraído das folhas de *C. carpinifolia*

	Composto	TR	IR calc.	%
1	Sabineno	8,18	921	5,00
2	<i>β</i> - Pineno	8,89	923	0,19
3	Eucaliptol	10,26	1003	2,08
4	<i>α</i>- Tujona	13,45	1091	38,14
5	<i>β</i>- Tujona	13,89	1094	22,43
6	Dihidrocarveol	14,55	1099	0,44
7	Verbenol	15,04	1101	0,48
8	<i>cis</i>- Pinocanfona	16,39	1109	5,55
9	Terpinen-4-ol	17,07	1110	0,64
10	<i>α</i> - Terpineol	17,74	1114	0,30
11	<i>α</i> - Copaeno	25,41	1293	3,29
12	<i>β</i>- Cariofileno	27,39	1379	7,28
13	<i>α</i> - Humuleno	28,82	1383	0,64
14	Germacreno-D	30,01	1387	4,35
15	Óxido de cariofileno	34,30	1481	2,65
			TOTAL	93,60
Componentes agrupados				
Hidrocarbonetos monoterpênicos				5,19
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos				15,56
Monoterpenos oxigenados				70,06
Sesquiterpenos oxigenados				2,65

*TR= tempo de retenção (minutos); IR calc.= índice de retenção calculado; %= porcentagem do composto; Valores de porcentagem menores que 0,05% representam compostos traço.

Figura 23- Estrutura química dos compostos presentes no óleo essencial.



*1= Sabineno; 2= β - Pineno; 3= Eucaliptol; 4= α - Tujona; 5= β - Tujona; 6= Dihidrocarveol; 7= Verbenol; 8= *cis*-Pinocanfona; 9= Terpinen-4-ol; 10= α - Terpeneol; 11= α - Copaeno; 12= β - Cariofileno; 13= α - Humuleno; 14= Germacreno-D; 15= Óxido de cariofileno. Fonte: Do autor (2018).

A mistura dos isômeros α e β - tujona corresponde a 60,57% da composição química do óleo essencial em estudo. A tujona é uma cetona monoterpênica, encontrada principalmente em espécies do gênero *Salvia* (família Lamiaceae). Dentre suas atividades farmacológicas, estudos citam suas propriedades analgésicas, anti-helmínticas, inseticidas e antitumorais (ZHOU et al., 2016).

Sá et al. (2016) avaliaram a influência da sazonalidade na composição química do óleo essencial de *C. carpinifolia*. Os autores identificaram hidrocarbonetos monoterpênicos (4,7-9,4%), sesquiterpenos oxigenados (11,2-17,1%), hidrocarbonetos sesquiterpênicos (13,6-37,3%) e monoterpênicos oxigenados (40,4-62,6%), apresentando-se esses últimos, assim como no presente trabalho, em maiores concentrações. Os constituintes majoritários foram β - pineno (2,9-5,3%), prenopsan-8-ol (4,2-9,6%), β - cariofileno (4,4-10,0%), *trans*-1-cadina-(6),4-dieno (2,8-17,5%), e 1,8- cineol (39,6 - 61,8%).

Os resultados divergentes dos obtidos no trabalho de Sá et al. (2016) remetem à influência dos fatores edafoclimáticos na síntese de metabólitos secundários descritos por Gobbo-Neto e Lopes (2007), como o clima, composição do solo, disponibilidade hídrica, ataque de patógenos, bem como aos diferentes quimiotipos da espécie (Figura 1).

Dados sobre a composição química do óleo essencial de *C. carpinifolia* ainda são escassos na literatura. No entanto, a tujona é descrita como constituinte majoritário de espécies pertencentes à família Lamiaceae e também ao gênero *Cantinoa*.

Botrel et al. (2010), avaliando a influência da sazonalidade na composição química do óleo essencial de *Hyptis marrobioides* (= *Cantinoa marrobioides*), identificaram como compostos majoritários os monoterpenos α - tujona (11,1-26,7 %) e β - tujona (23,1-24,4 %), não havendo diferença qualitativa ao longo das quatro estações. Em menores proporções, o α - tujona foi identificado no óleo essencial de *Hyptis suaveolens* (= *Cantinoa suaveolens*), representando 1,1% da composição química total (CONTI et al., 2012). Silva et al. (2013) identificaram como constituintes majoritários do óleo essencial de *Hyptis mutabilis* (= *Cantinoa mutabilis*) os compostos (-)- globulol (24,23%), *E*- cariofileno (13,95%), biciclogermacreno (9,05%), germacreno-D (8,69%), e α - tujona (6,00%). Esses resultados corroboram com os obtidos no presente trabalho.

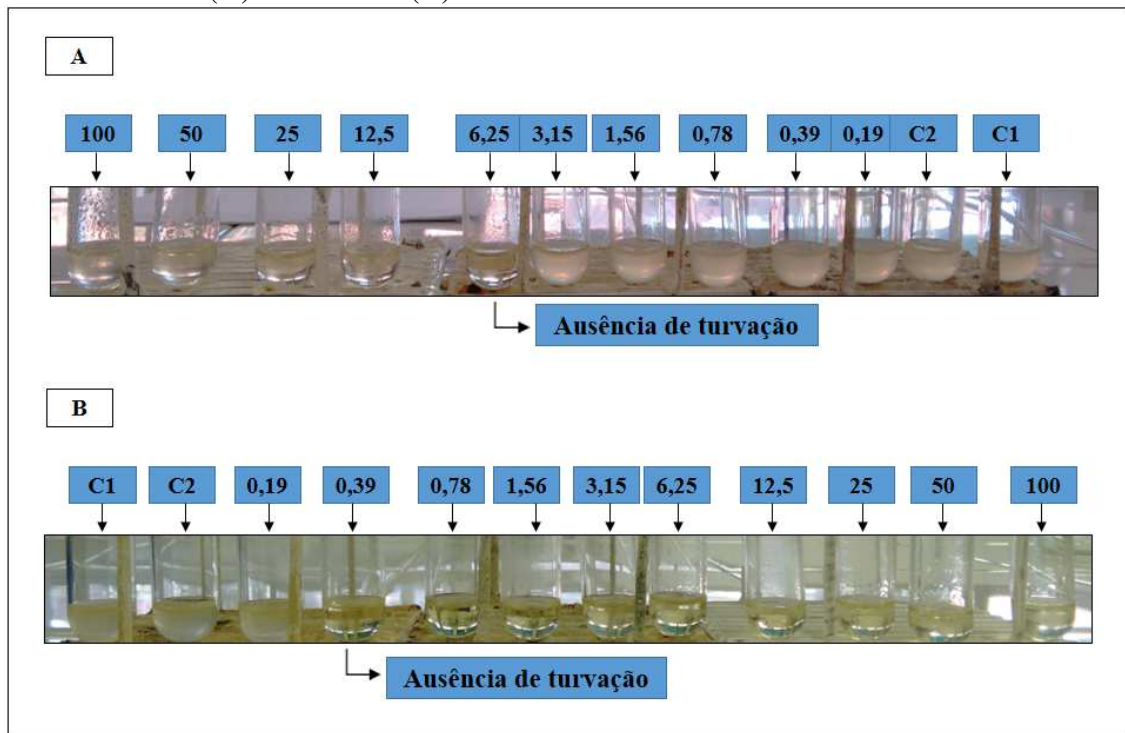
4.2 Concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) do óleo essencial de *C. carpinifolia* sobre *E. coli* e *S. aureus*

Os valores de CMI observados revelam o potencial bacteriostático do óleo essencial de *C. carpinifolia*, ou seja, a sua capacidade em inibir a multiplicação de ambas as bactérias no meio (Figura 24). Já o potencial bactericida foi verificado pela determinação da CMB, concentração responsável pela eliminação das cepas bacterianas, revelada pela ausência de crescimento na superfície do ágar.

Esses valores (CMI e CMB) coincidiram para ambas as bactérias, sendo que a cepa de *E. coli* mostrou-se sensível na concentração de **6,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$** , e a de *S. aureus* na concentração de **0,39 $\mu\text{L mL}^{-1}$** .

De acordo com a Figura 24, pode-se perceber que nenhum dos controles positivos apresentaram ausência de turvação, indicando que o solvente DMSO não influenciou na inibição dos microrganismos.

Figura 24- Ensaio de determinação da CIM do óleo essencial *C. carpinifolia* sobre as bactérias *E. coli* (A) e *S. aureus* (B).



*C1= DMSO + Caldo Mueller Hinton + inóculo; C2= Caldo Mueller Hinton + inóculo; Fonte: Do autor (2018).

Dentre as duas cepas avaliadas, *E. coli* mostrou-se mais resistente que *S. aureus*, fato que pode ser justificado por essa ser uma bactéria Gram-negativa, apresentando em sua estrutura uma membrana externa, que pode dificultar a penetração e ação dos constituintes do óleo essencial (VALERIANO et al., 2012).

Camargo et al. (2017) verificaram a atividade antibacteriana do óleo essencial de *H. carpinifolia* (= *C. carpinifolia*) sobre cepas Gram-negativas e Gram-positivas. Pelo método de Difusão em Cavidade Ágar, as CMIs observadas para as bactérias Gram-negativas foram de $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ para *E. coli* e $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ para *Salmonella Choleraesuis* e *P. aeruginosa*. Já as bactérias Gram-positivas, *S. aureus* e *Listeria monocytogenes*, apresentaram valores de 15,62 e $31,25 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

Corroborando com o presente trabalho, observa-se que as bactérias Gram-negativas também mostraram-se mais resistentes ao óleo essencial de *C. carpinifolia*; no entanto, os valores de CMIs foram superiores. Essa discordância pode ser justificada pelos diferentes métodos de avaliação da sensibilidade antibacteriana, sendo que no teste de Difusão em Cavidade Ágar, os constituintes do óleo essencial provavelmente não se difundiram adequadamente e, com isso, apresentaram maiores CMIs (FALEIRO, 2011).

O potencial de inibição bacteriana pode estar associado aos compostos majoritários presentes nos óleos essenciais, ou mesmo ao sinergismo existente entre esses.

De acordo com Hyldgaard; Mygind e Meyer (2012), os hidrocarbonetos terpênicos, representando 20,75% da composição química de *C. carpinifolia*, geralmente apresentam baixa atividade antibacteriana; no entanto, possuem efeito sinérgico na presença de outros constituintes com elevado potencial. Quando esses, por ação enzimática, são oxigenados, formam-se os terpenoides (72,71% do óleo essencial de *C. carpinifolia*), que, por sua vez, são considerados potentes antimicrobianos.

O aumento da ação antibacteriana dos compostos terpenoides pode ser relacionada aos seus grupos funcionais. Compostos fenólicos são altamente ativos, sendo revelada a importante acidez do hidrogênio da hidroxila em decorrência da deslocalização eletrônica no ciclo. Álcoois terpênicos mostram-se potentes bactericidas, assim como grupos carbonila geralmente promovem um aumento nas propriedades antibacterianas dos terpenoides. Compostos insaturados demonstram apresentar maior atividade que seus análogos saturados, assim como a estereoquímica do composto também apresenta influência, sendo que, na maioria dos compostos, as geometrias β e *trans* apresentam maior atividade que as geometrias α e *cis*, respectivamente (Saad et al., 2013).

Gupta et al. (2017) correlacionaram a atividade antibacteriana de óleos essenciais comerciais e extraídos de amostras vegetais e selvagens de *Boswellia serrata* Roxb. com seus principais constituintes químicos. Todas as amostras, assim como o óleo essencial em estudo, apresentaram como composto majoritário a α -tujona, variando entre as proporções de 22,5 e 69,8%. No entanto, de acordo com a correlação de Pearson, esse não foi o principal composto responsável pela atividade antibacteriana, apresentando uma correlação negativa (-0,259) para *S. aureus* e uma pequena correlação positiva para *E. coli* (0,144). Os constituintes que apresentaram correlação positiva máxima foram δ -3-carene (0,494) para *S. aureus*, e *p*-menta-1,5-dieno-8-ol (0,599) e α -pineno (0,562) para *E. coli*.

Os resultados de Gupta et al. (2017), relacionados com os obtidos no presente trabalho, indicam a importância do sinergismo existente entre os constituintes químicos do óleo essencial de *C. carpinifolia* e sua atividade antibacteriana.

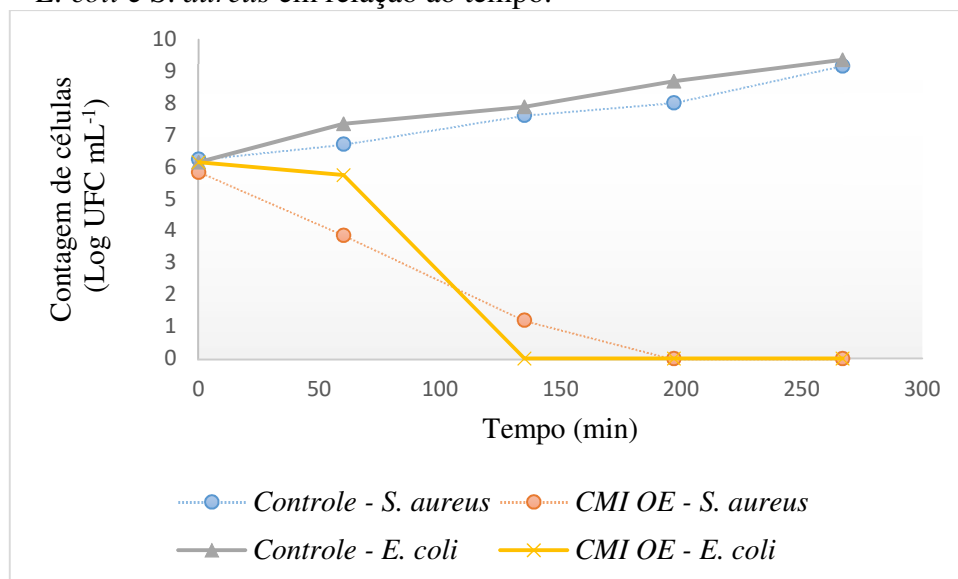
4.3 Efeito do óleo essencial de *C. carpinifolia* sobre a viabilidade celular de *E. coli* e *S. aureus* em relação ao tempo

Com base no teste para determinação da CMI e CMB, a CMI (=CMB) foi escolhida como concentração modelo para avaliar o mecanismo de ação antibacteriana do óleo essencial de *C. carpinifolia* sobre os microrganismos em estudo.

O potencial bactericida do óleo essencial foi confirmado pelo teste de viabilidade celular, no qual foi observada uma redução de células bacterianas viáveis proporcional ao tempo de exposição ao óleo essencial.

De acordo com a Figura 25, pode-se observar que o óleo essencial mostrou-se como um forte e rápido agente bactericida, inativando completamente as cepas bacterianas nos tempos de 135 min (*E. coli*) e 197 min (*S. aureus*), mantendo-as inativas nos demais tempos de avaliação.

Figura 25 - Efeito do óleo essencial de *C. carpinifolia* sobre a viabilidade celular bacteriana de *E. coli* e *S. aureus* em relação ao tempo.



*Controle= Inóculo (10⁶ UFC mL⁻¹); Os valores foram expressos em termos das Médias ± Desvio Padrão. Fonte: Do autor (2018).

Além disso, pode-se perceber que o tempo de morte bacteriana pelo óleo essencial em estudo varia em função dos microrganismos, embora a *E. coli* (135 min) tenha apresentado um tempo de morte menor que o de *S. aureus* (197 min), o qual foi mensurado em uma concentração maior (*E. coli*- 6,25 µL mL⁻¹; *S. aureus*- 0,39 µL mL⁻¹).

4.4 Efeito do óleo essencial de *C. carpinifolia* na permeabilidade e integridade da membrana celular bacteriana de *E. coli* e *S. aureus*

O efluxo de íons K^+ e a liberação de materiais celulares absorventes a 260 nm para o exterior da célula são indicativos sensíveis do comprometimento da permeabilidade e integridade da membrana celular bacteriana.

A membrana celular é responsável por promover uma barreira entre o meio externo e interno da célula, sendo permeável à passagem de eletrólitos importantes para as diversas funções celulares, tais como os íons K^+ . O vazamento desses íons indica um aumento da permeabilidade ou ruptura da membrana celular, afetando o funcionamento do metabolismo da célula bacteriana e provocando a lise.

Além do efluxo de íons potássio, um comprometimento na integridade da membrana celular bacteriana pode provocar a liberação de moléculas maiores, tais como ácidos nucleicos (DNA e RNA). Essas moléculas absorvem no comprimento de onda máximo de 260 nm, sendo, dessa forma, também chamadas de “materiais celulares absorventes a 260 nm” (SHUKLA et al., 2017).

Os resultados obtidos na avaliação da liberação de íons potássio utilizando o Kit Cálcio/Potássio e pelo método de Fotometria de chama estão descritos nas Tabelas 2 e 3, respectivamente. Essas mostram as médias das concentrações de íons potássio, sendo que, na tabela 3, verifica-se também a comparação entre as médias obtidas para cada intervalo de tempo e entre os tratamentos CMI e Controle no mesmo intervalo de tempo.

Tabela 2- Efeito do óleo essencial de *C. carpinifolia* no efluxo de íons potássio de *E. coli* e *S. aureus*, avaliado utilizando-se o Kit Cálcio/Potássio.

Tempo (min)	Concentração de íons potássio ($mg L^{-1}$)			
	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>	
	CMI	Controle	CMI	Controle
0	200,0	200,0	200,0	200,0
60	200,0	200,0	200,0	200,0
135	200,0	200,0	200,0	200,0
197	200,0	200,0	200,0	200,0
267	200,0	200,0	200,0	200,0

*CMI: Inóculo bacteriano tratado com o óleo essencial de *C. carpinifolia* na CMI; Controle: Inóculo bacteriano sem tratamento. Fonte: Do autor (2018).

Tabela 3- Efeito do óleo essencial de *C. carpinifolia* no efluxo de íons potássio de *E. coli* e *S. aureus* pelo método de Fotometria de chama.

Tempo (min)	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>	
	CMI	Controle	CMI	Controle
0	155,81 aA	161,04 aA	177,82 aA	174,35 aA
60	158,05 aA	161,54 aA	176,09 aA	169,15 aA
135	159,28 aA	164,55 aA	177,05 aA	173,55 aA
197	155,81 aA	161,03 aA	178,62 aA	173,35 aA
267	162,28 aA	162,28 aA	177,28 aA	166,79 aA

*Os valores de concentração de íons K^+ foram expressos em $mg\ Kg^{-1}$; CMI: Inóculo bacteriano tratado com o óleo essencial de *C. carpinifolia* na CMI; Controle: Inóculo bacteriano sem tratamento; Letras minúsculas iguais entre linhas não diferem estatisticamente pelo Teste de Kruskal-Wallis; Letras maiúsculas iguais entre colunas não diferem estatisticamente pelo Teste de Mann-Whitney. Fonte: Do autor (2018).

Observa-se que a concentração de íons potássio indicada pelo teste utilizando-se o Kit Cálcio/Potássio foi de $200,0\ mg\ L^{-1}$, permanecendo constante ao longo de todo o experimento.

Pelo método de Fotometria de chama, pode-se observar que para ambas as bactérias e ambos os tratamentos (CMI e Controle) não houve variação significativas entre os cinco tempos avaliados, assim como a concentração de íons potássio não diferiu estatisticamente quando comparado os tratamentos CMI e Controle.

Esses resultados sugerem que o óleo essencial de *C. carpinifolia* não influenciou na permeabilidade da membrana celular, de *E. coli* e *S. aureus*, aos íons K^+ , uma vez que não houve aumento na concentração desses íons, desde o tempo inicial de contato óleo essencial com o inóculo bacteriano ($t = 0\ min$) até o tempo de morte bacteriana (*E. coli*: $t = 135\ min$; *S. aureus*: $t = 197\ min$).

O aumento da permeabilidade celular bacteriana pode ser relacionado a óleos essenciais constituídos por compostos fenólicos, como carvacrol e timol. Esses compostos possuem como característica básica a acidez do hidrogênio da hidroxila, e, devido a ela, podem atuar como transportadores de membrana, promovendo um efluxo de K^+ e um influxo de H^+ . Os compostos fenólicos na forma associada podem se difundir através da membrana para o citoplasma, onde se dissociam liberando H^+ . Por sua vez, na forma dissociada podem se ligar a um íon K^+ e, novamente, se difundir pela membrana citoplasmática, do citoplasma para o ambiente externo, promovendo, assim, um desequilíbrio no gradiente de pH da célula (SAAD; MULLER; LOBSTEIN, 2013). Dessa forma, a ausência de compostos fenólicos na composição química do óleo essencial de *C. carpinifolia* (Figura 23) pode justificar a sua não influência na permeabilidade celular das bactérias estudadas aos íons K^+ .

De acordo com os dados descritos na Tabela 4, pode-se observar que o óleo essencial de *C. carpinifolia* não provocou extravasamento de materiais celulares absorventes a 260 nm em nenhuma das bactérias, uma vez que não houve variação significativa nos valores de absorbância, nem em relação ao tempo e nem quando comparado os tratamentos CMI e Controle. Dessa forma, possivelmente, o óleo essencial de *C. carpinifolia* não influenciou na integridade das membranas celulares de *E. coli* e *S. aureus*.

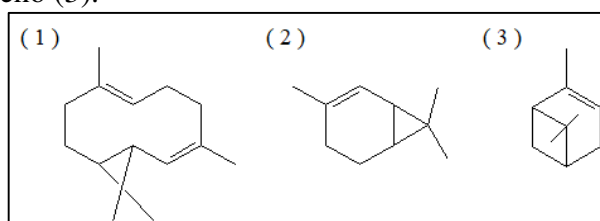
Tabela 4- Efeito do óleo essencial de *C. carpinifolia* na liberação de ácidos nucleicos de *E. coli* e *S. aureus*.

Tempo	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>	
	CMI	Controle	CMI	Controle
0	0,001 aA	0,000 aA	0,002 aA	0,002 aA
60	0,000 aA	0,000 aA	0,001 aA	0,001 aA
135	0,001 aA	0,001 aA	0,001 aA	0,002 aA
197	0,003 aA	0,002 aA	0,002 aA	0,001 aA
267	0,001 aA	0,001 aA	0,001 aA	0,003 aA

*Abs: Absorbância; CMI: Inóculo bacteriano tratado com o óleo essencial de *C. carpinifolia* na CMI; Controle: Inóculo bacteriano sem tratamento; Letras minúsculas iguais entre linhas não diferem estatisticamente pelo Teste de Kruskal-Wallis; Letras maiúsculas iguais entre colunas não diferem estatisticamente pelo Teste de Mann-Whitney. Fonte: Do autor (2018).

Pellegrini et al. (2017) correlacionaram os efeitos sobre a ruptura de membrana citoplasmática de óleos essenciais extraídos de oito plantas nativas da Argentina com seus constituintes químicos. Corroborando com o presente trabalho, os compostos α -tujona e verbenol, presentes na constituição química de *C. carpinifolia*, apresentaram correlação negativa com a ruptura da membrana celular de *Paenibacillus larvae*, ou seja, quanto maior a concentração desses compostos, menor foi o poder de ruptura de membrana dos óleos essenciais. Os constituintes biciclogermacreno, δ - 2- carene e α - pineno (Figura 26), cujas estruturas são semelhantes às dos constituintes presentes no óleo essencial de *C. carpinifolia*, também apresentaram uma correlação negativa.

Figura 26- Estrutura química dos compostos constituintes biciclogermacreno (1), δ - 2- carene (2) e α - pineno (3).



Fonte: Do autor (2018).

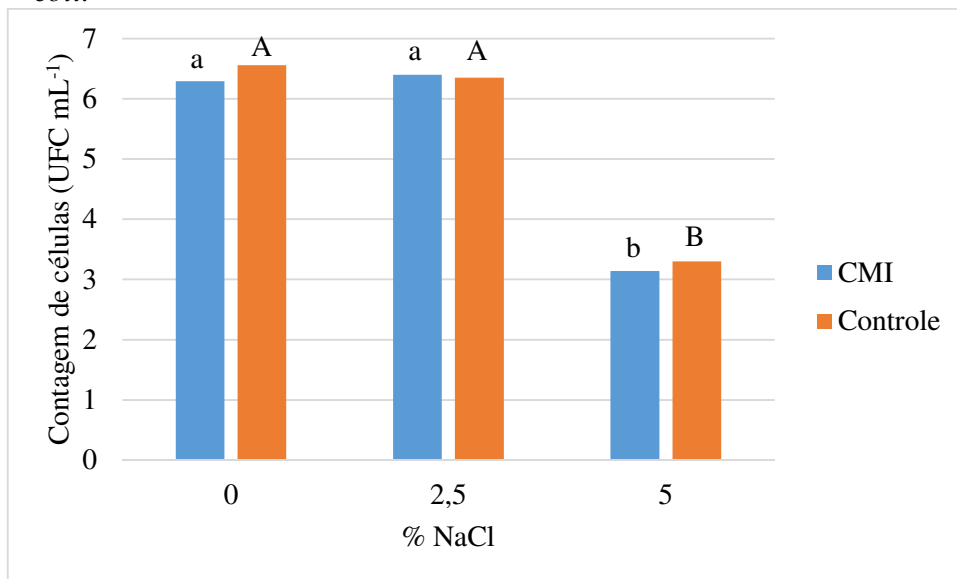
4.5 Efeito do óleo essencial de *C. carpinifolia* na capacidade de tolerância a sal de *E. coli* e *S. aureus*

Danos na membrana celular bacteriana também podem ser mensurados, de forma indireta, pela perda de tolerância a sal ou pela redução na capacidade de formação de colônias em meio de cultura sólido suplementado com NaCl.

Dessa forma, o teste de tolerância a sal é um indicativo de danos na membrana celular, acarretando alterações na permeabilidade celular bacteriana, evidenciadas por alterações na capacidade osmorreguladora da membrana celular, ou seja, a sua capacidade em controlar as concentrações salinas na célula que sejam adequadas para sua atividade metabólica.

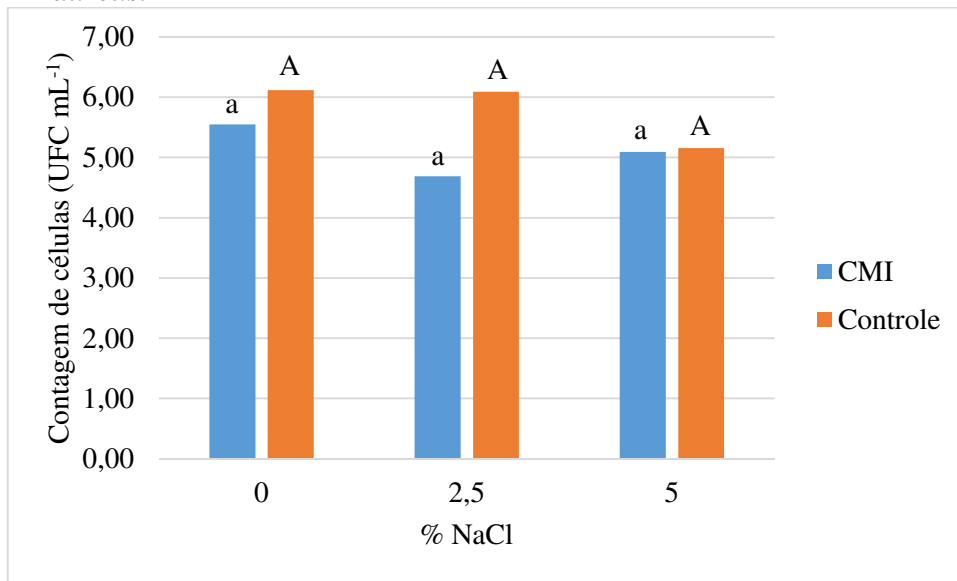
Nas Figuras 27 e 28, estão descritos os resultados obtidos na capacidade de formação de colônias de *E. coli* e *S. aureus* em Ágar Mueller-Hinton, suplementando com 0, 2,5 e 5% de NaCl, respectivamente.

Figura 27- Efeito do óleo essencial de *C. carpinifolia* na capacidade de tolerância a sal de *E. coli*.



*CMI: Inóculo bacteriano tratado com o óleo essencial de *C. carpinifolia* na CMI; Controle: Inóculo bacteriano sem tratamento; Letras minúsculas iguais entre os tratamentos CMI plaqueados em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de NaCl não diferem estatisticamente pelo Teste de Kruskal-Wallis; Letras maiúsculas iguais entre os tratamentos Controles plaqueados em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de NaCl não diferem estatisticamente pelo Teste de Mann-Whitney. Fonte: Do autor (2018).

Figura 28- Efeito do óleo essencial de *C. carpinifolia* na capacidade de tolerância a sal de *S. aureus*.



*CMI: Inóculo bacteriano tratado com o óleo essencial de *C. carpinifolia* na CMI; Controle: Inóculo bacteriano sem tratamento; Letras minúsculas iguais entre os tratamentos CMI plaqueados em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de NaCl não diferem estatisticamente pelo Teste de Kruskal-Wallis; Letras maiúsculas iguais entre os tratamentos Controles plaqueados em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de NaCl não diferem estatisticamente pelo Teste de Kruskal-Wallis. Fonte: Do autor (2018).

Pode-se observar que a adição de 2,5% de NaCl ao Ágar Mueller-Hinton não reduziu a capacidade de formação de colônia de células de *E. coli*, com e sem tratamento de óleo essencial (CMI e controle), quando comparados aos tratamentos plaqueados em meio de cultura sem suplementação salina. No entanto, nos tratamentos plaqueados em Ágar Mueller-Hinton contendo 5% de NaCl, houve uma redução significativa no número de colônias em ambos os tratamentos. Nessa concentração, houve a seleção de cepas tolerantes e eliminação das cepas sensíveis; no entanto, essa seleção não foi decorrente da presença do óleo essencial de *C. carpinifolia*, uma vez que também foi observada no tratamento controle.

As cepas de *S. aureus* não apresentaram intolerância a nenhum dos tratamentos suplementados com NaCl (2,5 e 5%). Esses resultados foram observados pela comparação entre os tratamentos (CMI e controle) plaqueados em Ágar Mueller-Hinton suplementados com aqueles inoculados em meio de cultura puro, não havendo diferença significativa no número de unidades formadoras de colônia entre eles.

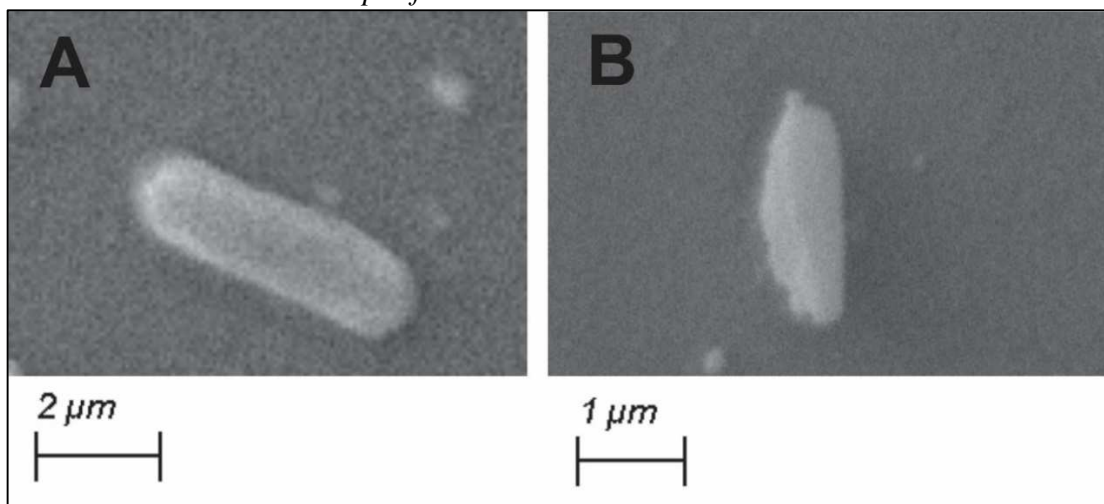
Esses resultados corroboram com os obtidos nos testes de liberação de íons potássio e integridade de membrana celular, enfatizando a hipótese de que o mecanismo de ação principal do óleo essencial de *C. carpinifolia* sobre os microrganismos em estudo não foi por interação com a membrana celular bacteriana, sugerindo que seu alvo celular foi ao nível do citosol.

4.6 Efeitos morfológicos provocados pelo óleo essencial de *C. carpinifolia* nas bactérias *E. coli* e *S. aureus*

Os efeitos morfológicos provocados pelo óleo essencial de *C. carpinifolia* sobre a superfície das células de *E. coli* e *S. aureus* foram avaliados por análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

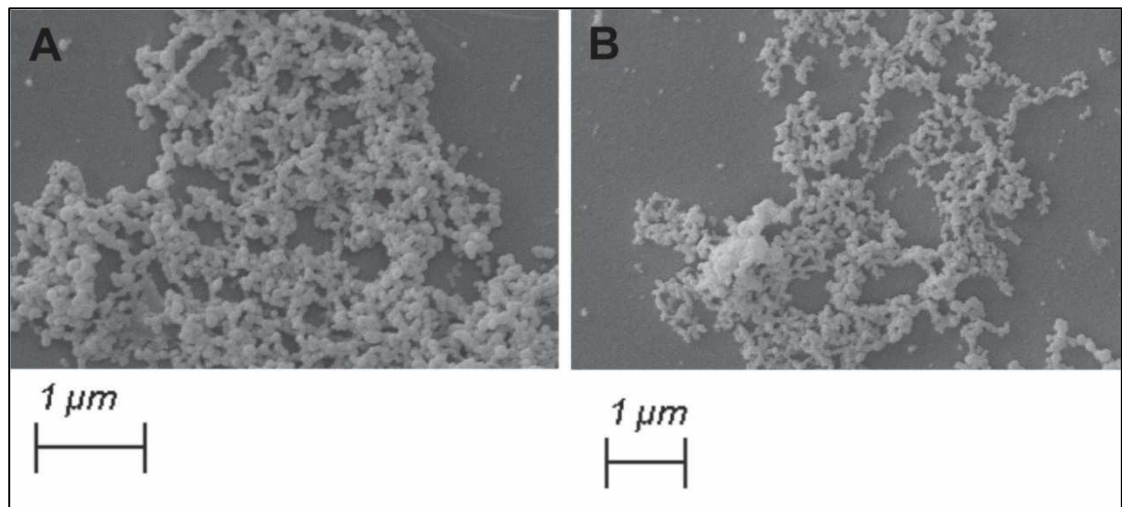
As eletromicrografias de ambos os tratamentos (CMI e Controle) estão mostradas na Figura 29 (*E. coli*) e 30 (*S. aureus*). Pode-se observar uma estrutura típica nas células de *E. coli* e de *S. aureus* nos grupos controle (Figura 29A e 30A), ao passo que nas células tratadas com o óleo essencial, percebe-se os efeitos nocivos sobre a morfologia de ambas, embora não tenha ocorrido o rompimento da membrana celular (Figura 29B e 30B).

Figura 29- Eletromicrografias de células de *E. coli* sem (A) e com (B) tratamento do óleo essencial de *C. carpinifolia* na CMI.



Fonte: Do autor (2018).

Figura 30- Eletromicrografias de células de *S. aureus* sem (A) e com (B) tratamento do óleo essencial de *C. carpinifolia* na CMI.



Fonte: Do autor (2018).

Com a análise de MEV, confirma-se a hipótese de que o óleo essencial de *C. carpinifolia* não apresentou como sítio de ação antibacteriana a membrana citoplasmática de *E. coli* e *S. aureus*, assumindo-se o pressuposto de que o alvo de ação foi intracelular.

Alterações intracitoplasmáticas bacterianas por ação de óleos essenciais também são relatadas na literatura. Szabó et al. (2010) averiguaram a inibição de moléculas auto-indicadoras de sensor quórum (QS) pelos óleos essenciais extraídos de rosas, gerânio, lavanda e alecrim. O QS é um processo de comunicação intra e intercelular dependente da densidade populacional, sendo responsável pela regulação da expressão gênica, controlando processos celulares, como a esporulação, formação de biofilmes, expressão de fatores de virulência e produção de bacteriocinas. Dessa forma, a inibição do QS por esses óleos essenciais desempenha um papel preponderante na redução do problema de resistência a antibióticos e virulência bacteriana.

Posteriormente, Saad; Muller e Lobstein, 2013 descreveram que álcoois terpênicos, como os compostos identificados no óleo essencial de *C. carpinifolia* dihidrocarveol, verbenol, terpinen-4-ol e α -terpineol, provocaram a inibição de microrganismos, provavelmente por desnaturação de proteínas.

Segundo Xu et al. (2016), os compostos eugenol, β -cariofileno, óxido de cariofileno e acetato de eugenila, presentes no óleo essencial de cravo-da-índia, provavelmente atuaram na inibição da síntese de DNA de *S. aureus* e apresentaram efeito sobre as proteínas, promovendo desnaturação, inibição e agregação.

5 Conclusões

Os constituintes químicos majoritários caracterizados no óleo essencial de *C. carpinifolia* foram os monoterpenos α - tujona, β - tujona, sabineno e *cis*- pinocanfeno, e o sesquiterpeno β - cariofileno.

O óleo essencial de *C. carpinifolia* apresentou potencial bacteriostático e bactericida sobre as cepas de *E. coli* e *S. aureus*; no entanto, não provocando danos na integridade da membrana celular por nenhum dos testes realizados, sugerindo que o possível alvo de ação celular foi intracitoplasmático.

Dessa forma, são necessários trabalhos adicionais para explorar o modo de ação da atividade antibacteriana do óleo essencial de *C. carpinifolia*.

REFERÊNCIAS

- BAJPAI, V. K. et al. Efficacy of (+)-Lariciresinol to Control Bacterial Growth of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157: H7. **Frontiers in microbiology**, v. 8, 2017.
- BAKER, C. A. et al. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in food: Incidence, ecology, and detection strategies. **Food Control**, v. 59, p. 407-419, 2016.
- BECERRIL, R. et al. Combination of analytical and microbiological techniques to study the antimicrobial activity of a new active food packaging containing cinnamon or oregano against *E. coli* and *S. aureus*. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 388, n. 5-6, p. 1003-1011, 2007.
- BOTREL, P. P. et al. Teor e composição química do óleo essencial de *Hyptis marruboides* Epl., Lamiaceae em função da sazonalidade. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 32, n. 3, p. 533-538, 2010
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Farmacopeia Brasileira**, Brasília, 5th ed.; n. 1, p. 198-199, 2010.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Metodologia dos Testes de Sensibilidade. a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada-Sexta Edição**, 2003.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil**. Junho de 2016. Disponível em: <<http://u.saude.gov.br/images/pdf/2016/junho/08/Apresenta----o-Surtos-DTA-2016.pdf>> Acesso em 13 de janeiro de 2017.
- BRASIL. Vigilância sanitária. **Doença transmitida por alimento (DTA)**. 2017a. Disponível em: <<http://www.vigilanciasanitaria.sc.gov.br/index.php/inspecao-de-produtos-e-servicos-de-saude/alimentos/91-area-de-atuacao/inspecao-de-produtos-e-servicos-de-saude/alimentos/415-doenca-transmitida-por-alimento-dta>> Acesso em 13 de janeiro de 2017.
- BRASIL. Vigilância sanitária. **Antimicrobianos – Bases Teóricas e Uso Clínico**. 2017b. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/conceitos.htm> Acesso em 05 de outubro de 2017.
- CAMARGO, K. C. et al. Antimicrobial Activity of the Essential Oil from *Hyptis carpinifolia* Benth. **American Journal of Plant Sciences**, v. 8, n. 11, p. 2871, 2017.
- CAILLET, Stéphane et al. Effect of gamma radiation and oregano essential oil on murein and ATP concentration of *Staphylococcus aureus*. **Journal of food science**, v. 74, n. 9, 2009.
- CONTI, B. et al. Larvicidal and repellent activity of *Hyptis suaveolens* (Lamiaceae) essential oil against the mosquito *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae). **Parasitology research**, v. 110, n. 5, p. 2013-2021, 2012.

DA SILVA-LUZ, C. L. et al. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Lamiaceae. **Boletim de Botânica**, v. 30, n. 2, p. 109-155, 2012.

DE ARAUJO, M. M.; LONGO, P. L. Teste da ação antibacteriana in vitro de óleo essencial comercial de *Origanum vulgare* (orégano) diante das cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 83, p. 01-07, 2016.

DE OLIVEIRA, M. M. M. et al. Morphological alterations in sessile cells of *Listeria monocytogenes* after treatment with *Cymbopogon* sp. essential oils. **MAGISTRA**, v. 26, n. 3, p. 385-392, 2017.

DE SOUZA, E. L. et al. Influence of *Origanum vulgare* L. essential oil on enterotoxin production, membrane permeability and surface characteristics of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, n. 2, p. 308-311, 2010.

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

DI PASQUA, R. et al. Changes in the proteome of *Salmonella enterica* serovar Thompson as stress adaptation to sublethal concentrations of thymol. **Proteomics**, v. 10, n. 5, p. 1040-1049, 2010.

EL ASBAHANI, A. et al. Essential oils: from extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 483, n. 1, p. 220-243, 2015.

FALEIRO, M. L. The mode of antibacterial action of essential oils. **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**, v. 2, p. 1143-1156, 2011.

FERREIRA, A. J. P.; KNÖBL, T. **Enfermidades bacterianas**. In: JÚNIOR BERCHIERI, A.; SILVA, NEPOMUCENO, E.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. Doenças das aves. Campinas: Facta, Cap. 4, p. 457-474. 2009.

FRANCO BDGM, LANDGRAF. **Microrganismos Patogênicos de Importância em Alimentos**. In: FRANCO BDGM, LANDGRAF. Microbiologia dos Alimentos. São Paulo: Editora Atheneu, p. 33-81. 2008.

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

GUPTA, M. et al. Chemical composition and bioactivity of *Boswellia serrata* Roxb. essential oil in relation to geographical variation. **Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology**, v. 151, n. 4, p. 623-629, 2017.

GUPTE, A. R.; DE REZENDE, C. L. E.; JOSEPH, S. W. Induction and resuscitation of viable but nonculturable *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 11, p. 6669-6675, 2003.

GUO, N. et al. The preservative potential of *Amomum tsaoko* essential oil against *E. coli*, its antibacterial property and mode of action. **Food Control**, v. 75, p. 236-245, 2017.

- HARLEY, R. M.; PASTORE, J. F. B. A generic revision and new combinations in the Hyptidinae (Lamiaceae), based on molecular and morphological evidence. **Phytotaxa**, v. 58, n. 1, p. 1-55, 2012.
- HOLLANDER, M.; Wolfe, D. A. Nonparametric Statistical Methods. New York: John Wiley & Sons, 1999.
- HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R. L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in microbiology**, v. 3, 2012.
- KONEMAN, E. et al. **Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas Colorido**. 6º Edição. Rio de Janeiro-RJ, Editora Guanabara Koogan, 2008.
- MALAVOLTA, E; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. Avaliação do estado nutricional das plantas. Princípios e aplicações. 2ª ed. Piracicaba : POTAFOS, 1997, 319p.
- MIRANDA, C. A. S. F. et al. Essential oils from leaves of various species: antioxidant and antibacterial properties on growth in pathogenic species. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 1, p. 213-220, 2016.
- OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.
- PATRA, J. K.; DAS, G.; BAEK, K. Antibacterial mechanism of the action of Enteromorpha linza L. essential oil against Escherichia coli and Salmonella Typhimurium. **Botanical Studies**, v. 56, n. 1, p. 13, 2015.
- PELLEGRINI, M. C. et al. Chemical Composition, Antimicrobial Activity, and Mode of Action of Essential Oils against Paenibacillus larvae, Etiological Agent of American Foulbrood on Apis mellifera. **Chemistry & biodiversity**, v. 14, n. 4, 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.
- SÁ, S. de et al. Chemical composition and seasonal variability of the essential oils of leaves and morphological analysis of Hyptis carpinifolia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 6, p. 688-693, 2016.
- SAAD, N. Y.; MULLER, C. D.; LOBSTEIN, A. Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 28, n. 5, p. 269-279, 2013.
- SHINOHARA, N. K. S. et al. Salmonella spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, n. 5, p. 1675-1683, 2008.
- SHUKLA, S. et al. Growth Inhibitory Effects of Adhatoda vasica and Its Potential at Reducing Listeria monocytogenes in Chicken Meat. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 1260, 2017.

SILVA, C. S.; MOURA, B. M. Espécies de Asteraceae e Lamiaceae Usadas na Medicina Popular da Região Sudeste para Problemas Respiratórios: O Que as Evidências Científicas Indicam. **Revista Fitos**, v. 6, n. 01, 2011.

SILVA, L. F. et al. Chemical Characterization, Antibacterial and Antioxidant Activities of Essential Oils of *Mentha viridis* L. and *Mentha pulegium* L. (L). **American Journal of Plant Sciences**, v.6, p. 666-675, 2015.

SILVA, L. L. et al. Sedative and anesthetic activities of the essential oils of *Hyptis mutabilis* (Rich.) Briq. and their isolated components in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 46, n. 9, p. 771-779, 2013.

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

SZABÓ, M. Á. et al. Inhibition of quorum-sensing signals by essential oils. **Phytotherapy research**, v. 24, n. 5, p. 782-786, 2010.

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

TEIXEIRA, M. L. **ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Cantinoa carpinifolia* (Benth.) e *Lippia organoides* Kunth.: COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E POTENCIAL FARMACOLÓGICO**. 2016. 191 p. Tese (Doutorado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

VALERIANO, C. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais em bactérias patogênicas de origem alimentar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu, v.14, n.1, p. 57-67, 2012.

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

World Health Organization. **WHO estimates of the global burden of foodborne diseases**. Foodborne diseases burden epidemiology reference group 2007-2015. 2015. Disponível em: http://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne_disease/fergreport/en/ Acesso em 14 de dezembro de 2016.

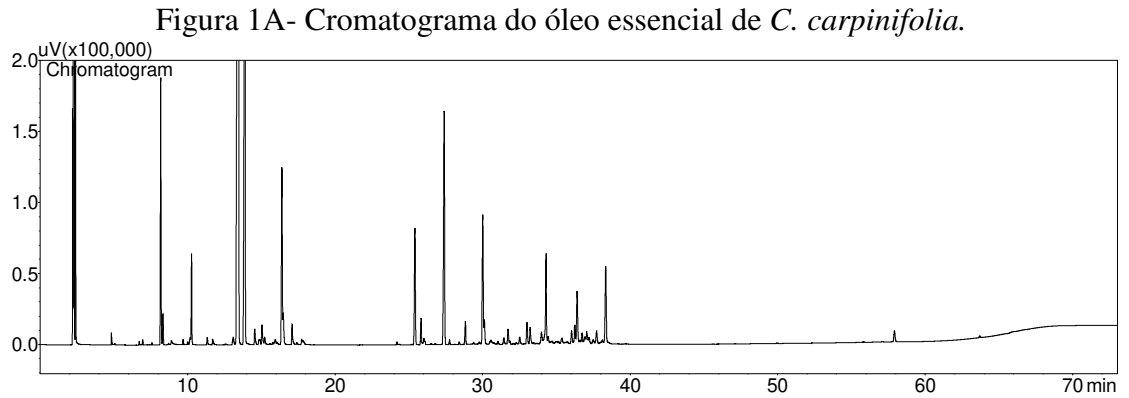
XU, J. et al. Chemical composition, antibacterial properties and mechanism of action of essential oil from clove buds against *Staphylococcus aureus*. **Molecules**, v. 21, n. 9, p. 1194, 2016.

YANG, X.; KHAN, I.; KANG, S. C. Chemical composition, mechanism of antibacterial action and antioxidant activity of leaf essential oil of *Forsythia koreana* deciduous shrub. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v. 8, n. 9, p. 694-700, 2015.

ZHOU, Y. et al. Enhancement of CD3AK cell proliferation and killing ability by α -Thujone. **International immunopharmacology**, v. 30, p. 57-61, 2016.

APÊNDICE

APÊNDICE A- Cromatograma do óleo essencial de *C. carpinifolia*



APÊNDICE B- Curva de crescimento de cepas de *E. coli* e *S. aureus* com e sem tratamento com a CMI do óleo essencial de *C. carpinifolia*

Tabela 1B- Curva de crescimento de cepas de *E. coli* e *S. aureus* com e sem tratamento com a CMI do óleo essencial de *C. carpinifolia*.

Tempo (min)	Número de colônias bacterianas (UFC mL ⁻¹)			
	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>	
	CMI	Controle	CMI	Controle
0	6,155 ± 0,009	6,155 ± 0,002	5,842 ± 0,256	6,254 ± 0,031
60	5,752 ± 0,045	7,354 ± 3,287	3,860 ± 0,004	6,718 ± 2,002
135	-	7,892 ± 0,035	1,204 ± 0,450	7,623 ± 1,236
197	-	8,695 ± 0,107	-	8,022 ± 0,007
267	-	9,362 ± 0,076	-	9,172 ± 1,350

APÊNDICE C – Descrições dos testes de liberação de íons K⁺ e ácidos nucleicos

Tabela 1C- Descrição entre os tempos para a concentração de íons potássio de *E. coli* e pelo método de Fotometria de chama.

Tempo (min)	CMI						Valor-p
	N	Média	E.P.	1° Q.	2° Q.	3° Q.	
0	3	155,81	3,02	153,20	155,81	158,43	
60	3	158,05	1,75	156,30	156,30	158,92	
135	3	159,28	1,76	157,52	157,52	160,16	0,05
197	3	155,81	0,00	155,81	155,81	155,81	
267	3	162,28	0,00	162,28	162,28	162,28	

Tempo (min)	Controle						Valor-p
	N	Média	E.P.	1° Q.	2° Q.	3° Q.	
0	3	161,04	3,02	158,43	161,04	163,65	
60	3	161,54	0,00	161,54	161,54	161,54	
135	3	164,55	1,76	162,79	162,79	165,43	0,05
197	3	161,03	0,00	161,03	161,03	161,03	
267	3	162,28	0,00	162,28	162,28	162,28	

*Valor-p > 0,05 não diferem estatisticamente pelo Teste de Kruskal-Wallis.

Tabela 2C- Descrição entre os grupos (CMI e Controle) para a concentração de íons potássio de *E. coli* pelo método de Fotometria de chama.

Tempo (min)	Grupo	N	Média	E.P	1° Q.	2° Q.	3° Q.	Valor-p
0	CMI	3	155,81	3,02	153,20	155,81	158,43	0,37
	Controle	3	161,04	3,02	158,43	161,04	163,65	
60	CMI	3	158,05	1,75	156,30	156,30	158,92	0,19
	Controle	3	161,54	0,00	161,54	161,54	161,54	
135	CMI	3	159,28	1,76	157,52	157,52	160,16	0,16
	Controle	3	164,55	1,76	162,79	162,79	165,43	
197	CMI	3	155,81	0,00	155,81	155,81	155,81	0,05
	Controle	3	161,03	0,00	161,03	161,03	161,03	
267	CMI	3	162,28	0,00	162,28	162,28	162,28	1,00
	Controle	3	162,28	0,00	162,28	162,28	162,28	

*Valor-p > 0,05 não diferem estatisticamente pelo Teste de Mann-Whitney.

Tabela 3C- Descrição entre os tempos para a concentração de íons potássio de *S. aureus* pelo método de Fotometria de chama.

Tempo (min)	CMI						Valor-p
	N	Média	E.P.	1° Q.	2° Q.	3° Q.	
0	3	177,82	6,26	171,75	174,35	182,16	0,98
60	3	176,09	4,59	171,75	174,35	179,56	
135	3	177,05	4,64	172,67	175,30	180,56	
197	3	178,62	5,27	173,35	173,35	181,26	
267	3	177,28	5,25	172,04	172,04	179,91	
Tempo (min)	Controle						Valor-p
	N	Média	E.P.	1° Q.	2° Q.	3° Q.	
0	3	174,35	5,20	169,15	169,15	176,96	0,53
60	3	169,15	3,01	166,55	169,15	171,75	
135	3	173,55	3,51	170,04	170,04	175,30	
197	3	173,35	3,05	170,71	173,35	175,99	
267	3	166,79	3,03	164,17	166,79	169,41	

*Valor-p > 0,05 não diferem estatisticamente pelo Teste de Kruskal-Wallis.

Tabela 4C- Descrição entre os grupos (CMI e Controle) para a concentração de íons potássio de *S. aureus* e pelo método de Fotometria de chama.

Tempo (min)	Grupo	N	Média	E.P	1° Q.	2° Q.	3° Q.	Valor-p
0	CMI	3	177,82	6,26	171,75	174,35	182,16	0,64
	Controle	3	174,35	5,20	169,15	169,15	176,96	
60	CMI	3	176,09	4,59	171,75	174,35	179,56	0,37
	Controle	3	169,15	3,01	166,55	169,15	171,75	
135	CMI	3	177,05	4,64	172,67	175,30	180,56	0,64
	Controle	3	173,55	3,51	170,04	170,04	175,30	
197	CMI	3	178,62	5,27	173,35	173,35	181,26	0,64
	Controle	3	173,35	3,05	170,71	173,35	175,99	
267	CMI	3	177,28	5,25	172,04	172,04	179,91	0,12
	Controle	3	166,79	3,03	164,17	166,79	169,41	

*Valor-p > 0,05 não diferem estatisticamente pelo Teste de Mann-Whitney.

Tabela 5C- Descrição entre os tempos para os valores de absorvância de cepas de *E. coli* tratadas com o óleo essencial de *C. carpinifolia*.

Tempo	CMI						Valor-p
	N	Média	E.P.	1° Q.	2° Q.	3° Q.	
0	3	0,001	0,000	0,000	0,001	0,001	0,32
60	3	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
135	3	0,001	0,000	0,001	0,001	0,002	
197	3	0,003	0,001	0,002	0,003	0,004	
267	3	0,001	0,000	0,001	0,001	0,002	

Tempo	Controle						Valor-p
	N	Média	E.P.	1° Q.	2° Q.	3° Q.	
0	3	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,08
60	3	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
135	3	0,001	0,001	0,001	0,002	0,002	
197	3	0,002	0,000	0,002	0,002	0,002	
267	3	0,001	0,001	0,000	0,001	0,002	

*Valor-p > 0,05 não diferem estatisticamente pelo Teste de Kruskal-Wallis.

Tabela 6C- Descrição entre os grupos (CMI e Controle) para os valores de absorvância de cepas de *E. coli* tratadas com o óleo essencial de *C. carpinifolia*.

Tempo	Grupo	N	Média	E.P.	1° Q.	2° Q.	3° Q.	Valor-p
0	CMI	3	0,001	0,000	0,000	0,001	0,001	0,35
	Controle	3	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
60	CMI	3	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,50
	Controle	3	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
135	CMI	3	0,001	0,000	0,001	0,001	0,002	1,00
	Controle	3	0,001	0,001	0,001	0,002	0,002	
197	CMI	3	0,003	0,001	0,002	0,003	0,004	0,64
	Controle	3	0,002	0,000	0,002	0,002	0,002	
267	CMI	3	0,001	0,000	0,001	0,001	0,002	0,81
	Controle	3	0,001	0,001	0,000	0,001	0,002	

*Valor-p > 0,05 não diferem estatisticamente pelo Teste de Mann-Whitney.

Tabela 7C- Descrição entre os tempos para os valores de absorvância de cepas de *S. aureus* tratadas com o óleo essencial de *C. carpinifolia*.

Tempo	CMI						Valor-p
	N	Média	E.P.	1° Q.	2° Q.	3° Q.	
0	3	0,002	0,001	0,002	0,002	0,003	0,22
60	3	0,001	0,000	0,001	0,001	0,002	
135	3	0,001	0,000	0,001	0,001	0,001	
197	3	0,002	0,001	0,002	0,002	0,002	
267	3	0,001	0,000	0,001	0,001	0,001	

Tempo	Controle						Valor-p
	N	Média	E.P.	1° Q.	2° Q.	3° Q.	
0	3	0,002	0,001	0,001	0,001	0,002	0,13
60	3	0,001	0,000	0,001	0,001	0,002	
135	3	0,002	0,001	0,002	0,002	0,002	
197	3	0,001	0,000	0,001	0,001	0,002	
267	3	0,003	0,000	0,003	0,003	0,004	

*Valor-p > 0,05 não diferem estatisticamente pelo Teste de Kruskal-Wallis.

Tabela 8C- Descrição entre os grupos (CMI e Controle) para os valores de absorvância de cepas de *S. aureus* tratadas com o óleo essencial de *C. carpinifolia*.

Tempo	Grupo	N	Média	E.P.	1° Q.	2° Q.	3° Q.	Valor-p
0	CMI	3	0,002	0,001	0,002	0,002	0,003	0,64
	Controle	3	0,002	0,001	0,001	0,001	0,002	
60	CMI	3	0,001	0,000	0,001	0,001	0,002	1,00
	Controle	3	0,001	0,000	0,001	0,001	0,002	
135	CMI	3	0,001	0,000	0,001	0,001	0,001	0,20
	Controle	3	0,002	0,001	0,002	0,002	0,002	
197	CMI	3	0,002	0,001	0,002	0,002	0,002	0,48
	Controle	3	0,001	0,000	0,001	0,001	0,002	
267	CMI	3	0,001	0,000	0,001	0,001	0,001	0,06
	Controle	3	0,003	0,000	0,003	0,003	0,004	

*Valor-p > 0,05 não diferem estatisticamente pelo Teste de Mann-Whitney.

APÊNDICE D – Descrição do teste de intolerância a sal

Tabela 1D- Descrição entre os diferentes tratamentos (CMI e Controle) para o número de colônias bacterianas de *E. coli* plaqueadas em Ágar Mueller-Hinton ,suplementado com diferentes concentrações de NaCl.

% NaCl	CMI						Valor-p
	N	Média	E.P.	1° Q.	2° Q.	3° Q.	
0,00	6	6,29	0,08	6,20	6,25	6,48	0,00
2,50	5	6,39	0,12	6,27	6,38	6,65	
5,00	6	3,14	0,17	3,20	3,26	3,40	

% NaCl	Controle						Valor-p
	N	Média	E.P.	1° Q.	2° Q.	3° Q.	
0,00	6	6,56	0,11	6,25	6,62	6,72	0,00
2,50	4	6,35	0,07	6,23	6,33	6,47	
5,00	6	3,30	0,09	3,24	3,30	3,51	

*Valor-p > 0,05 não diferem estatisticamente pelo Teste de Kruskal-Wallis.

Tabela 2D- Descrição entre os diferentes tratamentos (CMI e Controle) para o número de colônias bacterianas de *E. coli* plaqueadas em Ágar Mueller-Hinton, suplementado com diferentes concentrações de NaCl.

% NaCl	% NaCl			
	CMI		Controle	
	0,00	2,50	0,00	2,50
	Valor-p		Valor-p	
2,50	0,82	-	0,57	-
5,00	0,02	0,01	0,00	0,11

*Valor-p > 0,05 não diferem estatisticamente pelo Teste de comparação múltipla.

Tabela 3D- Descrição entre os diferentes tratamentos (CMI e Controle) para o número de colônias bacterianas de *S. aureus* plaqueados em Ágar Mueller-Hinton suplementado com diferentes concentrações de NaCl.

% NaCl	CMI						Valor-p
	N	Média	E.P.	1° Q.	2° Q.	3° Q.	
0,00	6	5,55	0,03	5,50	5,52	5,56	0,12
2,50	6	4,69	0,04	4,66	4,68	4,78	
5,00	6	5,09	0,36	4,25	5,07	5,95	

% NaCl	Controle						Valor-p
	N	Média	E.P.	1° Q.	2° Q.	3° Q.	
0,00	6	6,12	0,02	6,09	6,12	6,15	0,08
2,50	6	6,09	0,02	6,04	6,11	6,12	
5,00	6	5,16	0,37	4,43	5,09	6,06	

*Valor-p > 0,05 não diferem estatisticamente pelo Teste de Kruskal-Wallis.