



IANCA CARNEIRO FERREIRA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA e ATIVIDADES BIOLÓGICAS
DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Allium sativum*, *Coriandrum sativum*
e *Anethum graveolens***

**LAVRAS - MG
2022**

IANCA CARNEIRO FERREIRA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA e ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS ÓLEOS
ESSENCIAIS DE *Allium sativum*, *Coriandrum sativum* e *Anethum graveolens***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para obtenção do título de Mestre.

Prof^a Dra. Maria das Graças Cardoso
Orientador (a)

**LAVRAS - MG
2022**

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

Ferreira, Ianca Carneiro.

Caracterização química e atividades biológicas dos óleos essenciais de *Allium sativum*, *Coriandrum sativum* e *Anethum graveolens* / Ianca Carneiro Ferreira. - 2022.

87 p.: il.

Orientador(a): Maria das Graças Cardoso.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. Fontes naturais. 2. Compostos bioativos. 3. Especiarias. I. Cardoso, Maria das Graças. II. Título.

IANCA CARNEIRO FERREIRA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA e ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS ÓLEOS
ESSENCIAIS DE *Allium sativum*, *Coriandrum sativum* e *Anethum graveolens***

**CHEMICAL CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF THE
ESSENTIAL OILS FROM *Allium sativum*, *Coriandrum sativum* AND *Anethum graveolens***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para obtenção do título de mestre.

APROVADA em 22 de janeiro de 2022

Dr. Luís Roberto Batista UFLA

Dr. David Lee Nelson UFVJM

Prof (a) Dr (a) Maria das Graças Cardoso
Orientador (a)

**LAVRAS - MG
2022**

Ao Bom Deus, por seu infinito amor, bondade e por nunca me deixar desistir. A caminhada foi difícil e continuará sendo, mas sei que o Senhor sempre estará comigo. Muito obrigada por todas as bênçãos!

À Nossa Senhora, por interceder e guiar meus caminhos.

Ao meu irmão, Igor Carneiro, por ser a minha luz e me dar coragem para enfrentar as dificuldades da vida, sem perder a alegria de viver.

Aos meus pais, Mércia Magalhães e Jorge Araújo, pelo apoio e por estarem presentes mesmo quando não estão próximos fisicamente.

Aos meus amados avós, Elaide Dias Magalhães (*in memoriam*) e Manoel Vitório Carneiro (*in memoriam*), que sempre estarão presentes em cada conquista da minha vida. Obrigada por aquilo que seus lábios nunca pronunciaram, mas sua alma ousou sempre me ensinar (Padre Adriano Zandoná).

DEDICO!

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Departamento de Ciência dos Alimentos e ao Departamento de Química, pela oportunidade para a realização do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa concedida - Código de financiamento 001, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), pelo suporte financeiro.

À professora Dra. Maria das Graças Cardoso, pela orientação, acolhimento e disposição para ajudar. Muito obrigada por todos os ensinamentos que vão além do âmbito acadêmico.

Ao professor Luiz Roberto Batista, pela coorientação e por ter aberto as portas do laboratório para a execução dos experimentos.

Aos meus amigos Cássia Duarte, João Pedro Guimarães e Rafaela Brandão, por terem sido a minha família em Lavras. Vocês sempre serão meus irmãos mineiros.

Aos meus amigos Cássia, João, Bruna Cesário, Anderson, Rafael, Bruna Balduino, Pâmela, Emerson, pela amizade que construímos e todos os momentos de alegria.

Aos meus professores, Sérgio Tonetto de Freitas, Marcos dos Santos Lima e Ednaldo Gomes. São poucos os professores que realmente fazem a diferença na vida do aluno, mas Deus na sua infinita bondade colocou esses três mestres para abençoar o meu caminho. Muito obrigada por cada conselho e incentivo.

Aos colegas do Laboratório de Óleos Essenciais e de Análise de Qualidade de Aguardente pela convivência, companheirismo e o auxílio na condução do experimento, em especial a Vanúzia, Gabriela Campolina, Alex, Cássia, Antônia Isadora e Marcus Vinícius.

Ao pessoal do Laboratório de Micologia de Alimentos, Taís, Thalissa, Suzana e Fabiana, pelo auxílio nas atividades.

Aos Professores do programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras que contribuíram para minha formação.

Quando me sinto fraco, então é que sou forte.

(2 Coríntios 12, 10)

RESUMO

Os óleos essenciais têm alcançado grande destaque por apresentarem uma variedade de compostos voláteis conferindo-lhes um enorme potencial biológico em diversas aplicações. Conduziu-se este estudo com o objetivo de analisar a composição química e a atividade biológica dos óleos essenciais de *Allium sativum* (alho), *Coriandrum sativum* (coentro) e *Anethum graveolens* (endro). Os óleos essenciais foram extraídos pela técnica de hidrodestilação e caracterizados por cromatografia gasosa utilizando espectrômetro de massas (CG-EM) com detector de ionização de chama (CG-DIC). Os constituintes majoritários encontrados foram o linalol (93,28 %), carvona (83,04%) e trissulfeto dialila (75,13%) para os óleos coentro (OEC), endro (OEE) e alho (OEA), respectivamente. O efeito antimicrobiano dos óleos essenciais foi avaliado sobre as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* e, nos fungos micotoxigênicos, *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus ochraceus*. Foi observado que o OEC e OEE foram os mais eficientes no controle do crescimento bacteriano, apresentando uma Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB) de 6,25 e 12,50 $\mu\text{L mL}^{-1}$, respectivamente. Entretanto, pelo método de difusão em disco, o OEA inibiu completamente o crescimento da bactéria *S. aureus*, como também para ambos os fungos em todas as concentrações testadas. Nos tratamentos com os OEC e OEE, a atividade antifúngica teve uma relação dose-dependente conforme as concentrações. O OEA também foi eficiente em causar a diminuição da atividade da acetilcolinesterase, obtendo uma concentração inibitória média (IC_{50}) de 9,67 $\mu\text{g mL}^{-1}$, porém, não apresentou resultados para os outros ensaios antioxidantes. O OEC apresentou um resultado satisfatório no ensaio antioxidante do ácido tiobarbitúrico (IC_{50} : 8,02 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e na redução do complexo fosfomolibdênio (0,025 nm). Pelos resultados, verificou-se que o OEA é promissor para o desenvolvimento de sanitizantes, fármacos e agroquímicos.

Palavras chaves: Fontes naturais, compostos bioativos, especiarias.

ABSTRACT

Essential oils have received much attention because they contain a variety of volatile compounds that are responsible for their biological potential in several publications. The objectives of this work were to analyze the chemical composition and the biological activity of the essential oils from *Allium sativum* (garlic), *Coriandrum sativum* (coriander), and *Anethum graveolens* (dill). The essential oils were extracted using the hydrodistillation technique and characterized by GC-MS and GC-FID. The principal constituents found were linalool (93.28%), carvone (83.04%), and diallyl trisulfide (75.13%) for coriander (CEO), dill (EEO), and garlic (AEO) oils, respectively. The essential oils' antimicrobial effect was evaluated against the bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* and against the fungi *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus*. CEO and EEO were observed to be the most efficient in controlling bacterial growth, showing a minimum inhibitory concentration (MIC) of 6.25 $\mu\text{L mL}^{-1}$ and a minimum bactericide concentration of 12.50 $\mu\text{L mL}^{-1}$. However, when using the disc diffusion method, it was observed that AEO completely inhibited *S. aureus* growth, as well as the growth of both fungi at all tested concentrations. For CEO and EEO, a dose-dependent relationship with the concentrations was observed for the antifungal activity. A decrease in acetylcholinesterase activity in the presence of AEO was observed, obtaining a half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of 9.67 $\mu\text{g mL}^{-1}$, but no activities were observed in the antioxidant assays. Satisfactory results in the antioxidant assay using thiobarbituric acid (IC_{50}) (8.02 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and in the reduction of the phosphomolybdenum complex (0.025 nm) were only observed with the essential oil from CEO. The AEO shows promise for the development of sanitizers, drugs and agrochemicals.

Keywords: Natural sources, bioactive compounds, spices.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

Figura 01 – Estruturas químicas de compostos organossulfurados.....	22
Figura 02 – Aspecto geral da espécie <i>Coriandrum sativum</i>	23
Figura 03 – Estruturas químicas do Linalol (a) e <i>cis</i> - 2-decenal (b).....	23
Figura 04 – Sementes de <i>Anethum graveolens</i> (a); Estrutura química da Carvona (b).....	25
Figura 05 – Esquema das rotas metabólicas responsáveis pela síntese dos metabólitos secundários.....	27
Figura 06 – Biossíntese do isopentenil pirofosfato.....	29
Figura 07 – Biossíntese do isopentenil difosfato pela via DXPS.....	31
Figura 08 – Biossíntese dos terpenos.....	32
Figura 09 – Unidade básica de fenilpropanoides.....	33
Figura 10 – Biossíntese dos fenilpropanoides a partir do ácido chiquímico.....	34
Figura 11 – Mecanismos de ação dos óleos essenciais.....	36
Figura 12 – Estrutura da parede celular bacteriana.....	38
Figura 13 – Mecanismos de resistência bacteriana dos antibióticos.....	41
Figura 14 – Estruturas químicas dos antioxidantes naturais.....	46
Figura 15 – Estruturas químicas dos antioxidantes sintéticos.....	47
Figura 16 – Hidrólise da acetilcolina catalisada pela enzima acetilcolinesterase.....	49

SEGUNDA PARTE

Figura 1 – Chemical structures of diallyl trisulfide (a) and diallyl tetrasulfide (b).....	69
Figura 2 – Chemical structure of linalool.....	70
Figura 3 – Chemical structure of carvone.....	70
Figura 4 – Inhibition of the mycelial growth of <i>Aspergillus carbonarius</i> (A) and <i>Aspergillus ochraceus</i> (B) by the EOs from <i>C. sativum</i> , <i>A. graveolens</i> and <i>A. sativum</i>	74
Figura 5 – Effect of EO concentration on acetylcholinesterase enzyme activity.....	75

Figura 6 – Antioxidant capacity of EOs in three colorimetric assays. A: ABTS ($\mu\text{g mL}^{-1}$); B: TBARS ($\mu\text{g mL}^{-1}$); C: Phosphomolybdenum (Abs nm).....78

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE

Tabela 1 – Chemical compositions of EOs from <i>C. sativum</i> , <i>A. graveolens</i> and <i>A. sativum</i>	68
Tabela 2 – Minimum Inhibitory Concentration ($\mu\text{L mL}^{-1}$) and Mínimum Bactericidal Concentration ($\mu\text{L mL}^{-1}$) of the essential oils from <i>C. sativum</i> , <i>A. graveolens</i> and <i>A. sativum</i> against the <i>E. coli</i> and <i>S. aureus</i> bacteria.....	71
Tabela 3 – Percent inhibition of the mycelial growth of <i>Aspergillus carbonarius</i> e <i>Aspergillus ochraceus</i> by the EOs from <i>C. sativum</i> , <i>A. graveolens</i> and <i>A. sativum</i>	73

LISTA DE QUADROS

PRIMEIRA PARTE

Quadro 1 – Classificação das micotoxinas quanto à sua carcinogenicidade.....	44
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AchE	Acetilcolinesterase
Ach	Acetilcolina
a_w	Atividade de água
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasora
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
OE	Óleo essencial
Tnase	Termonuclease

LISTA DE SIGLAS

ABTS	Ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosina trifosfato
BHA	Butil-hidroxi-anisol
BHI	Brain Heart Infusion
BHT	2,6-di-tert-butil-4-hidroxitolueno
CDC	Centro de Prevenção de Doenças
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMB	Concentração Mínima Bactericida
CFI	Concentração Mínima Inibitória
DMAPP	Dimetilalil pirofosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2-Difenil-1-Picrilhidrazil
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico
DXPS	1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FPM	Força Próton Motiva
FPP	Farnesil pirofosfato
FTR	Fator de transferência de resistência
GC/ DIC	Cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama
GC/ MS	Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas
GGPP	Geranyl geranyl pirofosfato
GPP	Geranyl pirofosfato
IPP	Isopentenil pirofosfato
MRSA	Methicillin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
OTA	Ocratoxina

PAL	Fenilamina amônia liase
PG	Galato de propila
pH	Potencial Hidrogeniônico
SISVAR	Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados
TBARS	Ácido tiobarbitúrico
TBHQ	Tert-butilhidroquinona
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UFLA	Universidade Federal de Lavras

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE – INTRODUÇÃO GERAL	18
1. INTRODUÇÃO	19
2. REFERENCIAL TEÓRICO	21
2.1 Plantas em estudo	21
2.1.1 <i>Allium sativum</i>	21
2.1.2 <i>Coriandrum sativum</i>	23
2.1.3 <i>Anethum graveolens</i>	24
3.0 Metabolismo secundário das plantas	25
4.0 Óleos essenciais	28
4.1 Atividades Biológicas dos Óleos Essenciais	35
4.1.2 Atividade Bactericida	35
4.1.3 Atividade Fungicida	42
4.1.3.1 Micotoxinas	42
4.1.4 Radicais Livres e Atividade Antioxidante	44
4.1.5 Atividade Anticolinesterásica	49
3 . CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS	52
SEGUNDA PARTE	61
ARTIGO 1 – Chemical characterization and biological activities of the essential oils from <i>Allium sativum</i>, <i>Coriandrum sativum</i> and <i>Anethum graveolens</i>	61
ABSTRACT	62
1. INTRODUCTION	62
2. MATERIAL AND METHODS	64
2.1 Raw material: extraction and chemical characterization of EOs	64
2.2 Evaluation of antimicrobial activity	64
2.2.1 Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Bactericidal Concentration (MBC) and antimicrobial activity by disc diffusion	64
2.2.2 Effect of EOs on mycelial growth of mycotoxigenic fungi	66
2.3 In vitro antioxidant capacity	66
2.4 Effect of EOs on acetylcholinesterase enzyme activity	66

2.5 Statistical analysis.....	67
3. RESULTS AND DISCUSSION.....	67
3.1 Chemical characterization of the essential oils	67
3.2 Antimicrobial activity.....	70
3.2.1 Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) by the disk diffusion method	70
3.2.2 Inhibitory effect of EOs on mycelial growth of mycotoxigenic fungi	72
3.3 Effect of EOs on acetylcholinesterase enzyme activity	75
3.4 <i>In vitro</i> antioxidant activity of EOs (AOX)	76
4. CONCLUSION.....	80
REFERENCES	81

PRIMEIRA PARTE – INTRODUÇÃO GERAL

1. INTRODUÇÃO

Algumas espécies de bactérias são capazes de causar doenças nos seres vivos e contaminar os alimentos, sendo denominadas de microrganismos patogênicos, que podem ser transmitidos por alimentos e água quando contaminados, causando as doenças transmitidas por alimentos (DTAs). Atualmente, as DTAs são consideradas um grande problema de saúde pública em todo o mundo e são representadas especialmente pelo grupo das bactérias. Algumas espécies de fungos também se destacam como importantes patógenos e agentes deteriorantes de alimentos, sendo responsáveis por causar consideráveis perdas econômicas e também por produzir metabólitos secundários denominados de micotoxinas. Algumas espécies do gênero *Aspergillus* são produtoras dessas substâncias, as quais apresentam efeitos tóxicos e causam problemas agudos e crônicos para a saúde humana e dos animais.

Quando se fala em qualidade, esse termo não se resume apenas na segurança microbiológica; as características nutricionais e sensoriais de um produto também são consideradas uns dos pilares. Diante disso, as reações de oxidação estão sendo constantemente investigadas na área médica e alimentícia. Essas reações produzem naturalmente substâncias altamente reativas devido a uma deficiência eletrônica, conhecidas como radicais livres. Os radicais livres participam de diversas reações bioquímicas e atuam no sistema imunológico durante processos infecciosos. No entanto, em excesso, esses intermediários reagem com macromoléculas e contribuem para o desenvolvimento de muitas enfermidades, além de causar a rancidez oxidativa em alimentos ricos em lipídios. Para inibir a oxidação de um substrato, utilizam-se antioxidantes, substâncias que neutralizam os radicais livres.

A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima responsável por encerrar a transmissão dos impulsos nervosos por meio da hidrólise da acetilcolina (ACh). ACh é um neurotransmissor responsável por propagar um impulso elétrico ao outro neurônio. Sabe-se que o desenvolvimento e a progressão de algumas doenças neurodegenerativas são correlacionados com a diminuição dos níveis de ACh. Dessa maneira, são utilizados inibidores para impedir a hidrólise do neurotransmissor, aumentando assim, a concentração da ACh na fenda sináptica. A AChE também está sendo objeto de muitas pesquisas para o desenvolvimento de agroquímicos, visto que alguns pesticidas agem inibindo essa enzima, o que pode levar ao acúmulo de ACh e causar uma superestimulação no sistema nervoso central, que em altas doses pode ser fatal. Assim, trabalhos que utilizam embalagens ativas com a incorporação de compostos bioativos vêm sendo estudadas

e desenvolvidas, visando aumentar a vida pós-colheita de frutos e hortaliças pela inibição da praga, como também o desenvolvimento de fármacos.

Dentre umas das medidas realizadas para garantir a segurança alimentar e o controle de pragas, pode-se citar a utilização de substâncias químicas sintéticas. No entanto, o uso abusivo e indiscriminado de antibióticos e agroquímicos vem aumentando os números de cepas e pragas resistentes. Aliado a isso, a busca do mercado consumidor por produtos naturais vem estimulando a utilização de fontes naturais como alternativas aos produtos químicos tradicionais. Nesse cenário, os óleos essenciais (OEs) vêm se destacando por apresentarem uma variedade de compostos voláteis que conferem seu potencial biológico. Os constituintes presentes nos OEs incluem majoritariamente às classes dos terpenos e fenilpropanoides, cuja bioatividade depende da configuração estrutural da molécula. Dada a diversidade dos grupos funcionais e as diferenças estruturais, é provável que as atividades biológicas dos OEs não sejam atribuídas a um mecanismo de ação específico. Sabe-se que os efeitos antioxidantes, antimicrobianos e inibição enzimática são explicados pela presença de anéis aromáticos e um grupo hidroxila livre, que permite a formação de ligações de hidrogênios com sítios ativos de enzimas e são capazes de estabilizar radicais livres.

Algumas especiarias como as espécies de *Allium sativum*, *Coriandrum sativum* e *Anethum graveolens*, amplamente utilizadas como condimentos, são produtoras de OEs e possuem compostos biologicamente ativos. Objetivou-se neste trabalho caracterizar os OEs de *Allium sativum* (alho) *Coriandrum sativum* (coentro) e *Anethum graveolens* (endro) e avaliar sua atividade antimicrobiana sobre bactérias patogênicas e fungos micotoxigênicos, bem como analisar sua capacidade antioxidante por meio de métodos colorimétricos e seu efeito na atividade da enzima acetilcolinesterase.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Plantas em estudo

As plantas são utilizadas pelo homem desde a antiguidade e ainda são bastante empregadas nos dias atuais, sendo considerada a base da medicina moderna. Muitos fármacos hoje utilizados foram desenvolvidos a partir de diferentes fontes naturais, e por meio do avanço tecnológico e científico, foi possível compreender o mecanismo de ação das substâncias biologicamente ativas, como também avaliar os efeitos tóxicos (SIMÕES *et al.*, 2017). As especiarias estão incluídas neste grupo, e apesar de serem amplamente utilizadas como condimentos, possuem diversos compostos que contêm propriedades farmacológicas, entre elas as espécies de *Allium sativum*, *Coriandrum sativum* e *Anethum graveolens*.

2.1.1 *Allium sativum*

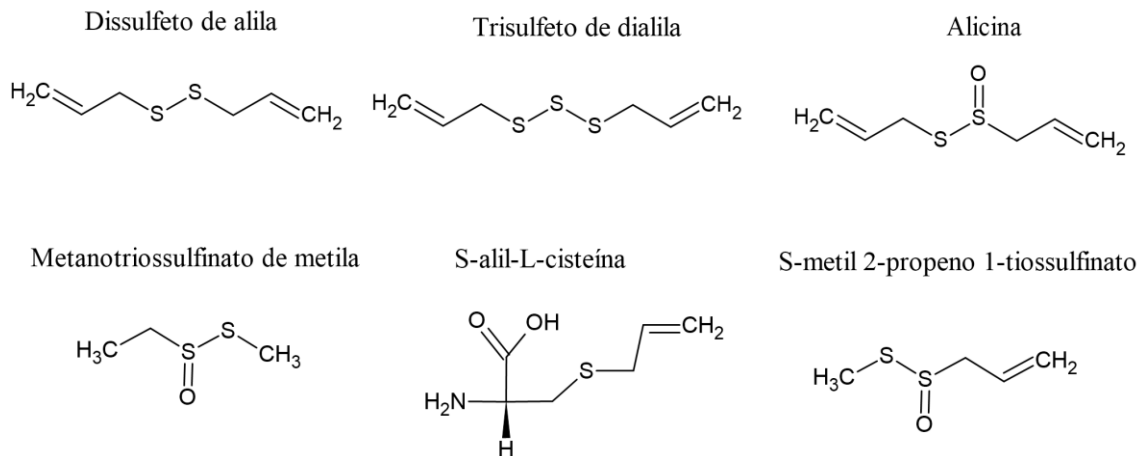
O gênero *Allium* é constituído por cerca de 600 a 700 espécies. Dentre as espécies mais conhecidas e estudadas, estão o alho (*Allium sativum*), a cebola (*Allium cepa*), o alho-poró (*Allium ampeloprasum* var. *Porrum*), a cebolinha (*Allium schoenoprasum*) e a chalota (*Allium ascalonicum*) (POOJARY *et al.*, 2017). Alguns estudos relataram uma associação entre a redução da incidência de câncer do trato gastrointestinal e de mama com o consumo de vegetais da espécie *Allium* (NICASTRO *et al.*, 2015; POURZAND *et al.*, 2016). Também foi verificada a diminuição do risco de doenças cardiovasculares (SALJOUGHIAN *et al.*, 2017) e diversas outras propriedades biológicas, entre elas, antimicrobiana, antioxidante, antiviral, antiprotozoária, anti-inflamatória, antiasmática e inibidora de enzimas (urease xantina oxidase) (BISEN; EMERALD, 2016; NILE *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2013).

As espécies do gênero *Allium* possuem metabólitos secundários que contêm átomos de enxofre e são denominados de organossulfurados. As atividades bioativas comentadas anteriormente são atribuídas principalmente a essas substâncias, as quais são biossintetizadas quando o tecido vegetal é danificado. Após o dano no tecido, sulfóxidos de cisteína (compostos não voláteis armazenados no citoplasma quando as células estão intactas) interagem com a enzima alinase piridoxal-5-fosfato, produzindo ácidos sulfínicos, substâncias quimicamente

instáveis que podem ser convertidas a outros compostos sulfurosos, como os tiossulfatos, os quais podem sofrer rearranjos e produzir ampla variedade de compostos derivados de enxofre, entre eles sulfetos de alila, dissulfeto de dipropila, sulfeto de dipropila e tetrassulfeto de dialila. (LLANA-RUIZ-CABELLO *et al.*, 2015; POOJARY *et al.*, 2017). Na Figura 1, estão ilustradas as estruturas químicas de alguns compostos organossulfurados

Dentre os tiossulfatos presentes no alho, a alicina corresponde a 70 a 80% do total; em razão disso, é a substância responsável pelo odor característico do bulbo, que também é um indicador de qualidade, já que essa substância não é sintetizada no alho em sua forma intacta. Além da alicina, outros compostos organossulfurados também são encontrados em diferentes espécies de *Allium*, como metina (cebola, alho-poró), propina (chalotas) e isoalinina (cebolas e chalotas). Diversos fatores influenciam a composição química e o teor dos compostos bioativos entre as espécies, entre eles a variabilidade genética, fatores ambientais, as condições de cultivo (irrigação, fertilização) e também as condições pós-colheita (RAMIREZ *et al.*, 2017; PUTNIK *et al.*, 2019).

Figura 1 – Estruturas químicas de compostos organossulfurados.



Fonte: Autor, 2021.

Em relação à atividade antimicrobiana, ainda não foi totalmente elucidado o mecanismo de ação, mas sabe-se que a alicina e seus derivados inativam enzimas tiólicas dos microrganismos. Isso ocorre devido à rápida conversão em dissulfetos de alila, que altera o aminoácido L-cisteína (MARCHESE *et al.*, 2016). Essa atividade foi confirmada em diversos estudos contra bactérias Gram positivas, Gram negativas e fungos (BEHBAHANI; FOOLADI, 2018; PETROPOULOS *et al.*, 2018; SNOUSSI *et al.*, 2016).

2.1.2 *Coriandrum sativum*

Coriandrum sativum é uma erva mediterrânea pertencente à família Apiaceae. É uma planta conhecida popularmente como coentro ou salsa chinesa (Figura 2), amplamente utilizada na culinária como especiaria por suas propriedades sensoriais e aromatizantes. Em muitos países, o coentro é utilizado na medicina tradicional para o tratamento de diversas enfermidades, entre elas a ansiedade e a insônia (GASTÓN *et al.*, 2016; WEI *et al.*, 2019).

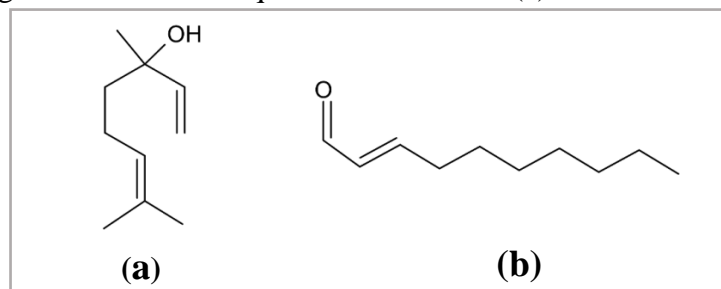
Figura 2 – Aspecto geral da espécie *Coriandrum sativum*.



Fonte: Barbara Cordovan.

Os fitoquímicos presentes em todas as partes da planta (sementes, caules e folhas) são responsáveis por suas propriedades biológicas. Foi relatado que o OE da semente de coentro possui atividade antimicrobiana (BAZARGANI; ROHLOFF, 2016; LASRAM *et al.*, 2019), anti-inflamatória, analgésica e antinociceptiva (TAHERIAN; VAFAEI; AMERI, 2012) e efeito sedativo (GASTÓN *et al.*, 2016) tendo-se o linalol (Figura 3 a) como o principal constituinte. Nas folhas, o constituinte majoritário encontrado é o *cis*-2-decenal (Figura 3 b) (WEI *et al.*, 2019).

Figura 3 – Estruturas químicas do Linalol (a) e *cis*- 2-decenal (b).



Fonte: Autor, 2021.

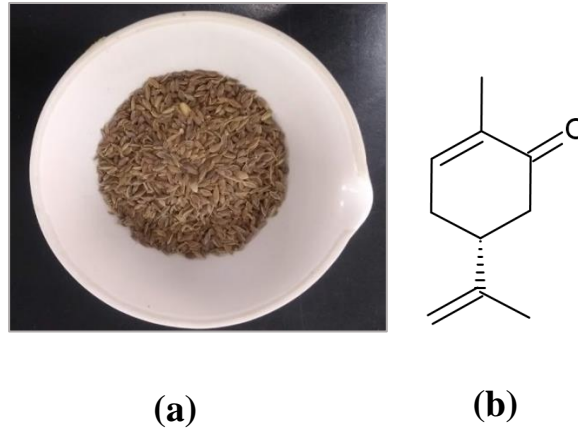
A variação dos compostos em diferentes partes da planta ocorre durante o seu crescimento. A composição química das folhas é semelhante à do caule na fase de plântula, contendo substâncias voláteis com odor doce e herbáceo; isso explica por que a população asiática utiliza as mudas de coentro como tempero. Nos estágios finais da floração, é observado um aumento dos níveis de *cis*-2-decenal (composto com odor irritante). Durante a maturação dos frutos, há uma diminuição dos teores de ésteres monoterpênicos e um aumento nos níveis de álcool monoterpênico e linanol, indicando que há uma conversão de substâncias durante o crescimento da planta (WEI *et al.*, 2019).

2.1.3 *Anethum graveolens*

Anethum graveolens é uma erva aromática pertencente à família Apiaceae, conhecida popularmente como endro. É uma planta originária do sudoeste da Ásia e da Europa, amplamente utilizada na culinária e na medicina tradicional. As folhas são empregadas em sopas, saladas, carnes e as sementes em chá e pães (AL-SHEDDI *et al.*, 2019; NAIDU *et al.*, 2016). Algumas pesquisas relataram que o OE ou o extrato do endro (sementes ou folhas) podem ser utilizados no tratamento de câncer de útero (TARIQ *et al.*, 2017), diabetes (GOODARZI *et al.*, 2016) e no controle de fungos deteriorantes (TIAN *et al.*, 2011). Também foram mencionados que os fitoquímicos presentes no extrato possuem efeitos hepatoprotetores, podendo ser uma possível alternativa como um fármaco para o tratamento de carcinoma hepatocelular (MOHAMMED *et al.*, 2018).

A composição química dos metabólitos secundários é fortemente influenciada pelas condições ambientais de cultivo, bem como a idade e o desenvolvimento da planta. Por isso é encontrada na literatura uma diferença na concentração e composição química dos OEs da semente de endro (Figura 4 a), tendo-se a carvona (Figura 4 b), limoneno, α -felandreno, p-cimeno e dilapiole como os principais constituintes (MANZUOERH *et al.*, 2019; AL-SHEDDI *et al.*, 2019).

Figura 4 – Sementes de *Anethum graveolens* (a); Estrutura química da Carvona (b).



Fonte: Autor, 2021.

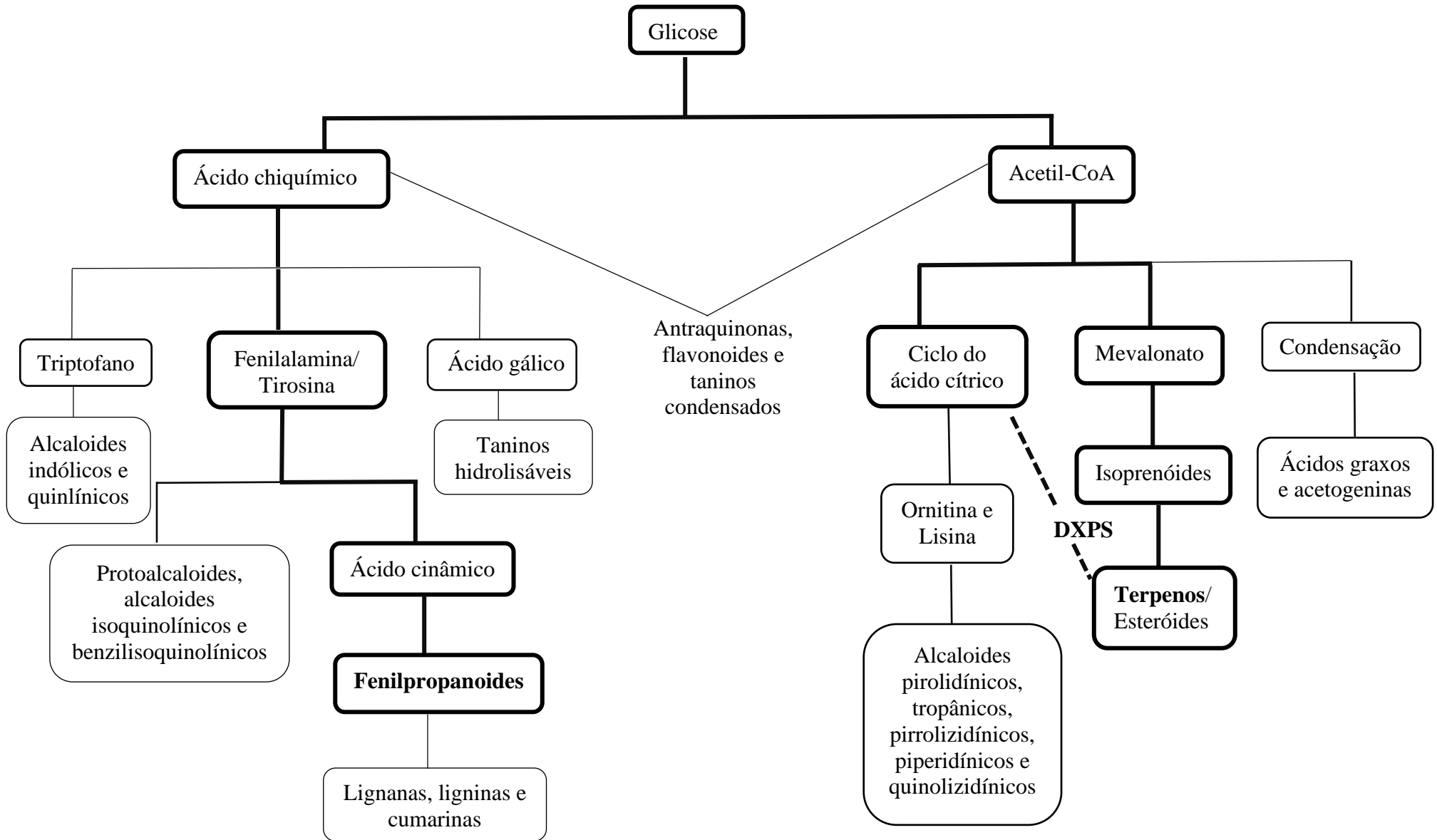
3.0 Metabolismo secundário das plantas

A utilização de fontes naturais pelo homem é relatada desde a antiguidade. A busca na natureza para atender as suas necessidades básicas é registrada por diversos povos, entre eles gregos, romanos e chineses. Com o desenvolvimento da medicina tradicional, foi possível o entendimento do mecanismo de ação e o princípio ativo das plantas consideradas medicinais. Dessa forma, muitas substâncias químicas foram identificadas (CRAGG; NEWMAN, 2013). Esses compostos biologicamente ativos são sintetizados por rotas metabólicas específicas, oriundas do metabolismo secundário. O metabolismo primário é responsável pela síntese de moléculas essenciais para o desenvolvimento da planta. Os metabólitos secundários são compostos que, na maioria das vezes, possuem baixo peso molecular e apresentam importantes funções na vida das plantas (PATRA *et al.*, 2013).

Os metabólitos secundários são subdivididos em grupos, constituídos por estruturas complexas que conferem suas propriedades biológicas. Apesar de não participar efetivamente do crescimento da planta, desempenham funções essenciais para sua sobrevivência, uma vez que sua síntese está associada com as condições ambientais de cultivo e fatores como estresse hídrico, irradiações ultravioletas, assim como o ataque de patógenos podem estimular a sua produção. Dessa maneira, a atuação desses metabólitos consiste em proteger as plantas do ataque de herbívoros e patógenos, contribuindo também para a cor e o aroma e, muitas vezes, participam do processo de polinização (SALAM; QUAVE, 2018).

Os metabólitos secundários são originários do metabolismo da glicose por meio das vias do ácido chiquímico e do acetato (Figura 5). O ácido chiquímico é o precursor dos compostos que apresentam anel aromático na sua estrutura, como fenilpropanoides, cumarinas, ligninas, taninos hidrossolúveis e alguns alcaloides. Já pela via do acetato, são gerados os terpenos, terpenoides e seus derivados. Existem alguns metabólitos que derivam de ambos os precursores, como é caso dos flavonoides, antraquinonas e taninos condensados (SIMÕES *et al.*, 2017).

Figura 5 – Esquema das rotas metabólicas responsáveis pela síntese dos metabólitos secundários.



Fonte: Adaptado Simões *et al.*, 2007.

4.0 Óleos essenciais

Entre os compostos de origem natural que possuem significativa atividade biológica, destacam-se os óleos essenciais (OEs), conjunto de substâncias químicas que estão sendo amplamente estudadas como alternativa aos produtos químicos sintéticos. Esses compostos levam estudiosos e pesquisadores à busca incansante por novos produtos que possam ser empregados como protótipos para novos medicamentos.

Os OEs são metabólitos secundários sintetizados naturalmente pelas plantas. Geralmente são extraídos por arraste com vapor d'água ou por hidrodestilação, mas também podem ser obtidos por meio da espremedura de pericarpos de frutos cítricos. Podem ser produzidos por todos os órgãos da planta, entre eles: botões florais, flores, folhas, caule, galhos, raízes e cascas, sendo armazenados em células secretoras ou tricomas glandulares. Apresenta como principal característica a volatilidade. Por essa razão, também são chamados de óleos voláteis ou essências. São poucos solúveis em água e solúveis em solventes orgânicos e a maioria deles possui densidade menor que a da água. São líquidos, raramente coloridos e instáveis na presença de luz, calor, umidade e metais (SIMÕES *et al.*, 2017).

Os OEs podem conter cerca de 20 a 60 substâncias em diferentes concentrações, geralmente caracterizado por dois ou três compostos que representam entre 20 a 70% da concentração total, denominados de componentes majoritários. A atividade biológica dos óleos pode ser atribuída à ação desses constituintes, assim como o sinergismo entre os outros componentes. Os terpenos e fenilpropanoides constituem basicamente a composição química dos óleos essenciais, formados a partir do acetato (terpenos) e ácido chiquímico (fenilpropanoides) (Figura 05) (BAKKALI *et al.*, 2008).

Os terpenos são a maior classe dos metabólitos secundários sintetizados por organismos vivos, apresentando maior diversidade estrutural, química e funcional. A maioria desses compostos é encontrada nas plantas, alguns deles atuando na fisiologia na forma de hormônio vegetal (giberelina, brassinoesteroides) e, por essa razão, são definidos como metabólitos primários. No entanto, a maior parte deles é sintetizada por rotas metabólicas específicas, restrita a uma determinada espécie vegetal e, por isso, são definidos como metabólitos secundários (especializados). Nessa categoria, incluem os terpenos voláteis representados por monoterpenos e sesquiterpenos, que desempenham funções relevantes na planta, entre elas a defesa contra

herbívoros e patógenos e a atração de polinizadores (PICHERSKY; RAGUSO, 2018; ZHOU; PICHERSKY, 2020).

Apesar da complexidade, todos os terpenos são sintetizados a partir do isopentenil pirofosfato (IPP) e seu isômero dimetilalil pirofosfato (DMAPP). Existem duas vias responsáveis pela formação desses intermediários, sendo elas: a via do mevalonato realizada no citoplasma e no retículo endoplasmático e via DXPS, que ocorre nos plastídios (ZHOU; PICHERSKY, 2020). Na Figura 6, encontra-se descrita a formação do IPP pela via do mevalonato a partir da molécula de acetil-CoA.

Figura 6 – Biossíntese do isopentenil pirofosfato (Continua).

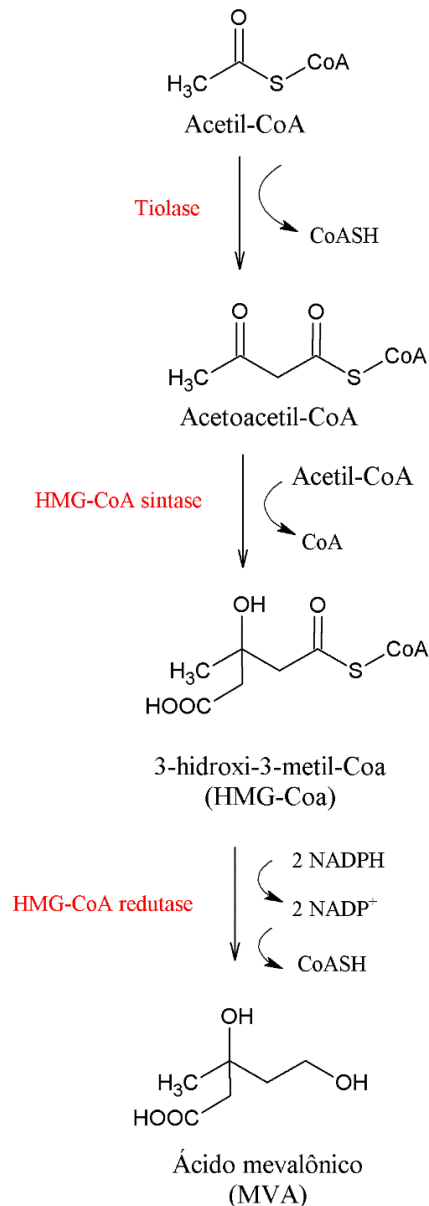
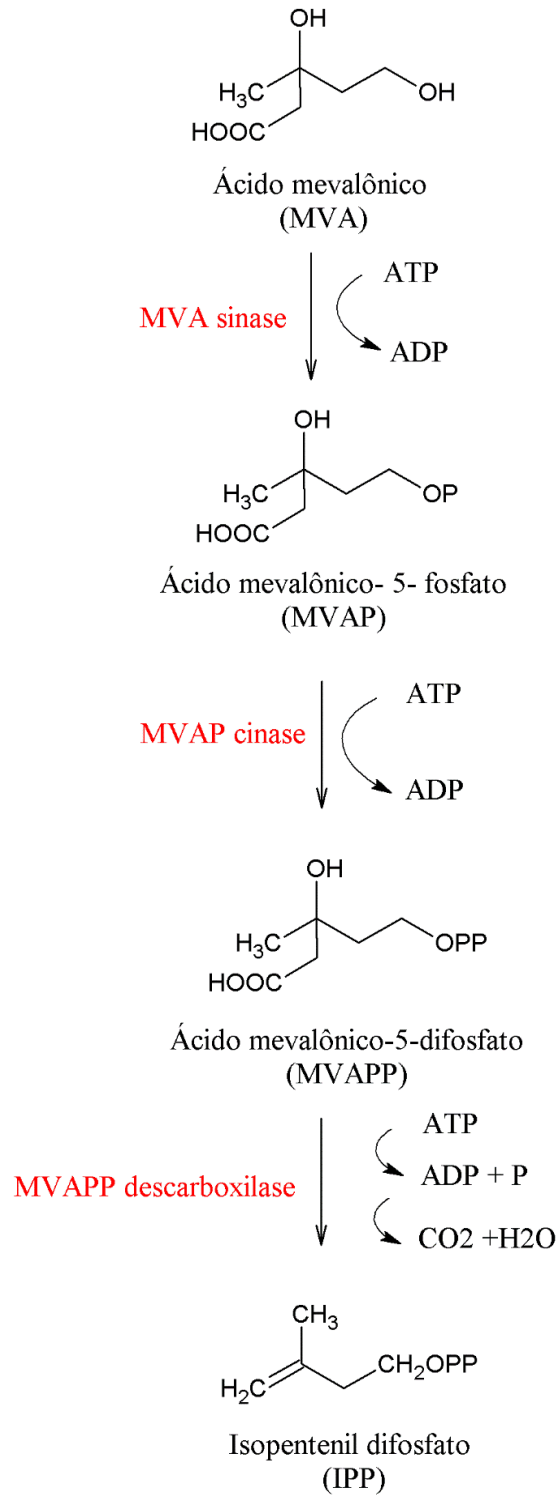
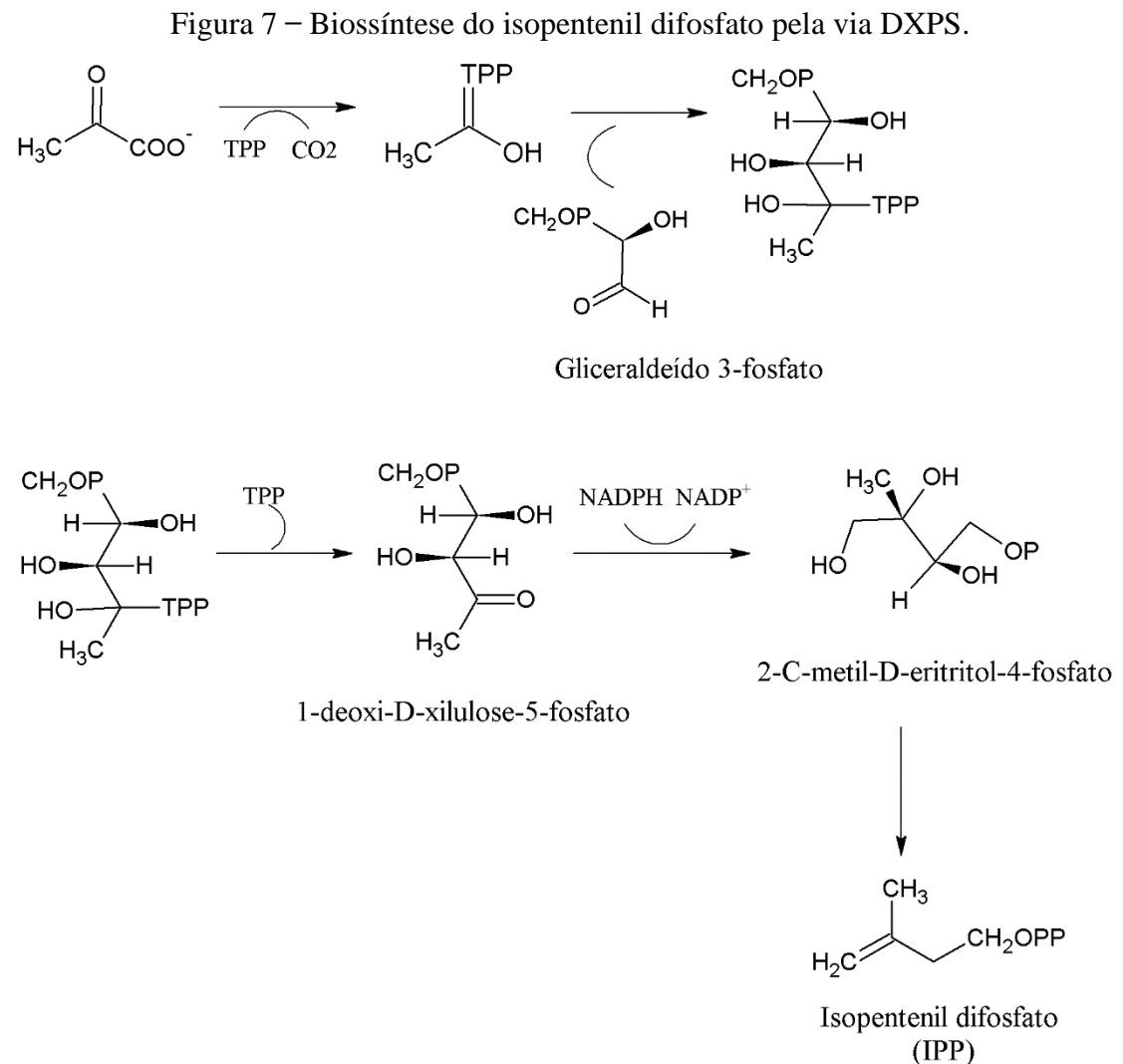


Figura 6 – Biossíntese do isopentenil pirofosfato (Conclusão).



Fonte: Buchanan; Grussem; Jones, 2015.

Além das plantas, a maioria das bactérias Gram-negativas, cianobactérias e algas verdes também são capazes de sintetizar terpenos pela via DXPS. A formação do IPP por essa via é iniciada com a reação do piruvato e o gliceraldeído-3-fosfato, dando origem ao 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato e posteriormente, ao 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato, que em seguida, transforma-o em IPP (Figura 7) (VRANOVA; COMAN; GRUISSEM, 2013; BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2015).

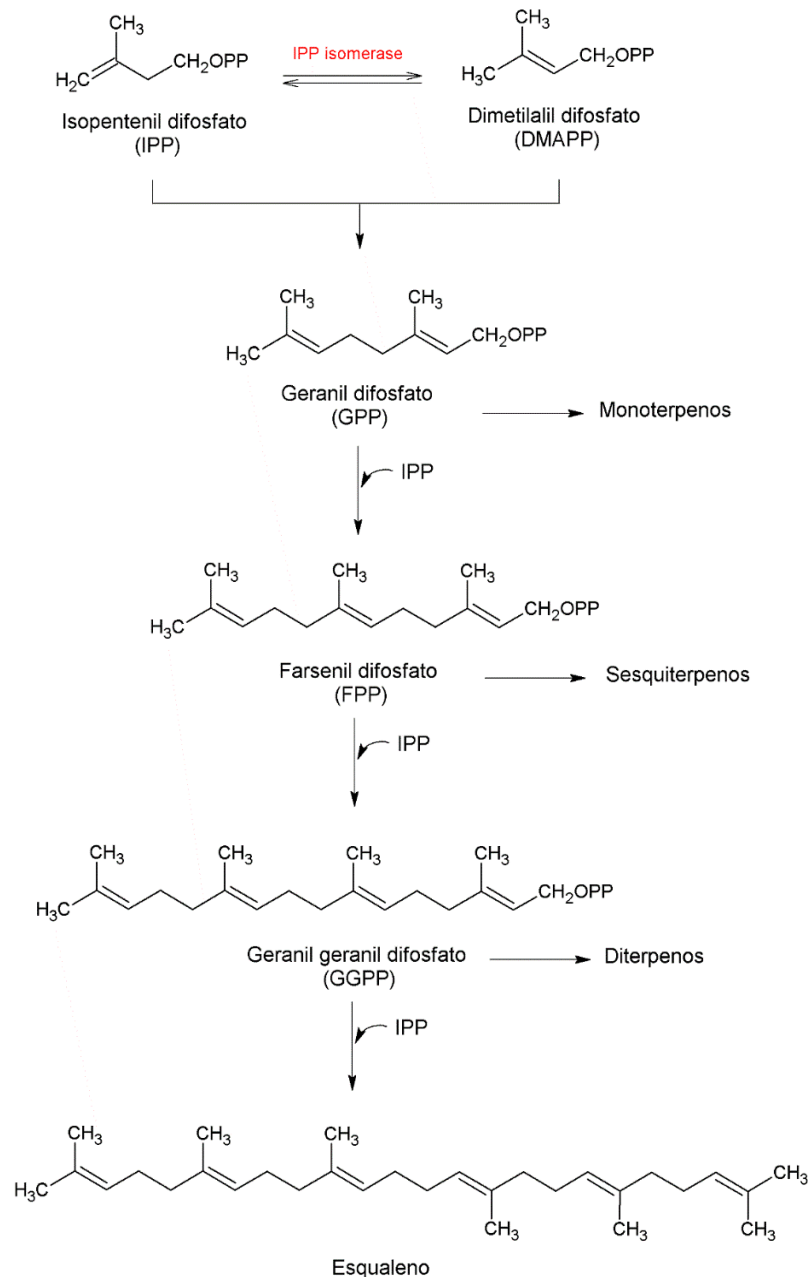


Fonte: Buchanan; Gruissem; Jones, 2015.

As classes dos terpenos são formadas inicialmente pela junção de duas moléculas de isopreno (C5), o que leva à formação dos monoterpenos (C10). Essa ligação ocorre pela reação eletrolítica das unidades de IPP e DMAPP, formando o geranyl pirofosfato (GPP, C10). O GPP

pode se ligar a outra molécula de IPP e formar o farnesil pirofosfato (FPP, C15), intermediário dos sesquiterpenos. A adição de outra molécula de IPP leva à formação do geranyl geranyl pirofosfato (GGPP, C20), precursor dos diterpenos (Figura 8). Assim, a junção de repetidas moléculas de IPP pode formar compostos com estruturas mais complexas, como triterpenos (C30) e tetraterpenos (C40) (SIMÕES *et al.*, 2017).

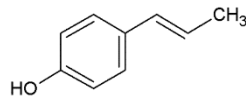
Figura 8 – Biossíntese dos terpenos.



Fonte: Buchanan; Grissem; Jones, 2015.

Os fenilpropanoides são uma classe de substâncias constituídas por uma estrutura central composta por um grupo fenil ligado a três átomos de carbono (Figura 9). Derivado da biossíntese do ácido chiquímico, é considerado um intermediário para outras vias bioquímicas, como a formação de ligninas, suberinas, cumarinas, ácido salicílico e a chalcona (estrutura básica dos flavonoides). A diversidade desses compostos confere aos fenilpropanoides uma ampla gama de funções nas plantas, atuando na pigmentação e, associada a isso, na atração de polinizadores, proteção UV, suporte estrutural, bem como respostas a estresses bióticos e abióticos (VANHOLME; EL HOUARI; BOERJAN, 2019).

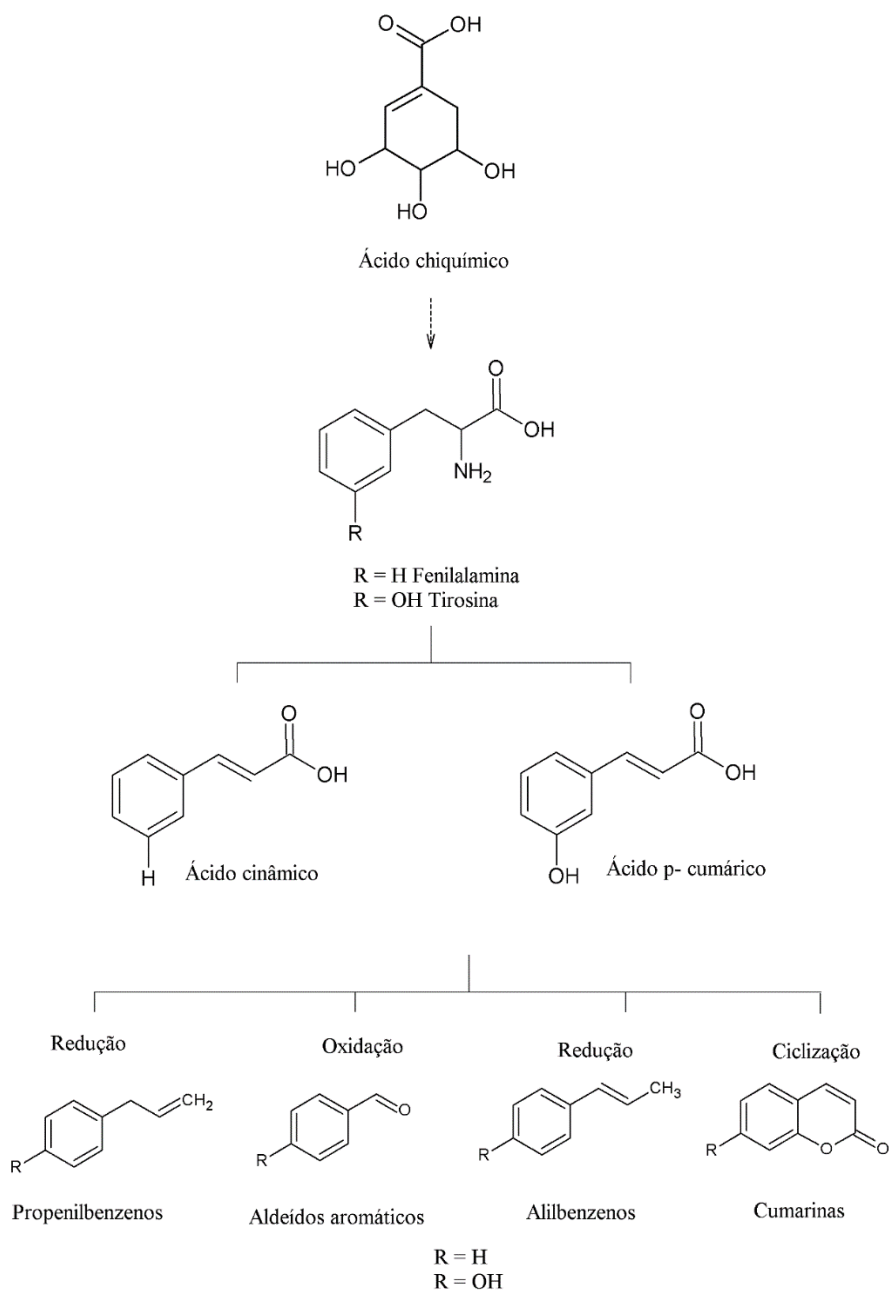
Figura 9 – Unidade básica de fenilpropanoides.



Fonte: Autor, 2020.

O ácido chiquímico é formado por uma série de reações enzimáticas que convertem dois intermediários da via glicolítica (fosfoenopiruvato) e da pentose fosfato (eritrose-4-fosfato) em ácido corísmico, o precursor de aminoácidos aromáticos como a fenilamina e a tirosina. Por meio da enzima fenilamina amônia liase (PAL), ocorre a eliminação da molécula de amônia, formando os ácidos cinâmico e p-cumárico (WIDHALM; DUDAREVA, 2015). A Figura 10 ilustra o esquema da biossíntese dos fenilpropanoides a partir do ácido chiquímico.

Figura 10 – Biossíntese dos fenilpropanoides a partir do ácido chiquímico.



Fonte: Simões *et al.*, 2017.

4.1 Atividades Biológicas dos Óleos Essenciais

4.1.2 Atividade Bactericida

Os OEs são antimicrobianos de fonte naturais encontrados em diversas plantas e apresentam atividade biológica sobre amplo espectro de microrganismos, incluindo patogênicos e deteriorantes. Rao, Chen e McClements (2019) citam que a atividade antimicrobiana de um OE está relacionada aos seus constituintes químicos, principalmente os majoritários e as interações com os outros componentes. Entre os compostos que apresentam alta atividade antimicrobiana, destacam-se o eugenol (derivado dos fenilpropanoides), o timol e o carvacrol (monoterpenos com características fenólicas). A atividade desses constituintes está associada ao seu grupo hidroxila livre, que permite a troca de próton e, conseqüentemente, a ruptura da membrana bacteriana, como também a presença do anel benzeno, que facilita a deslocalização de elétrons.

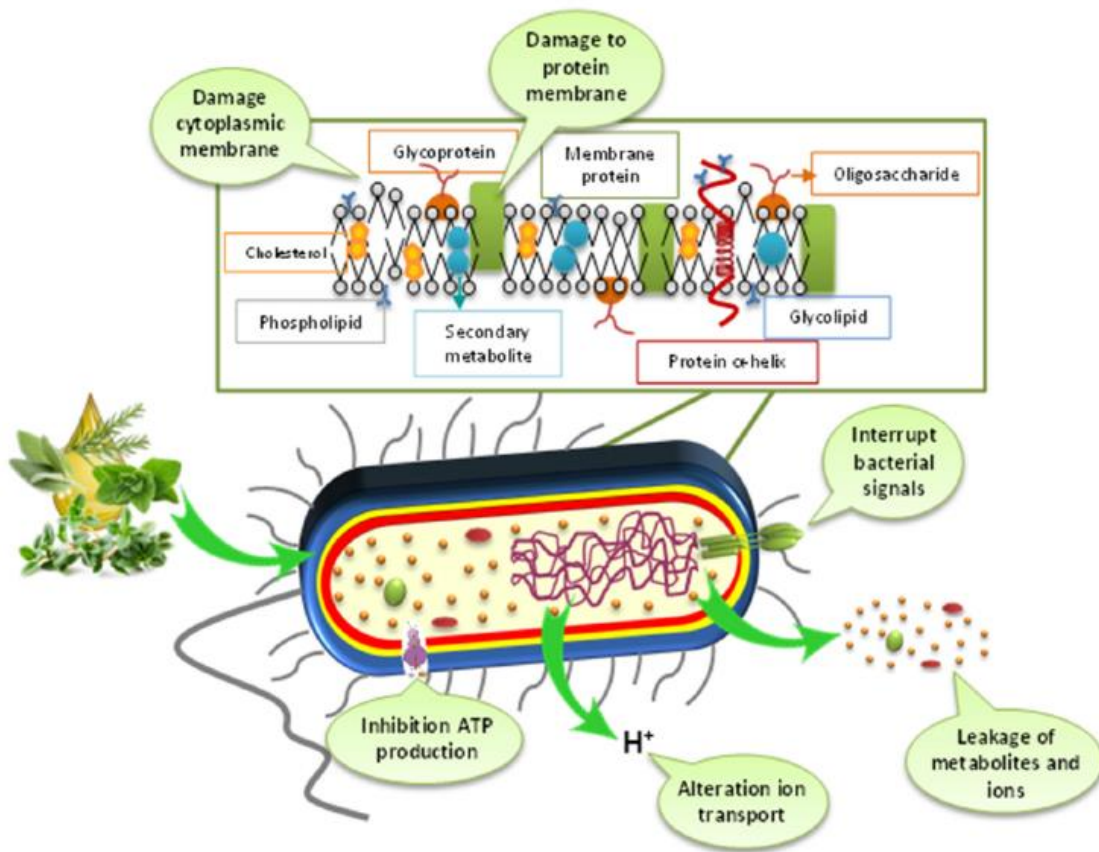
As interações da combinação de diferentes OEs ou dos constituintes químicos podem produzir efeitos aditivos, sinérgicos, antagônicos ou indiferentes. Considera-se aditivo quando os efeitos combinados são iguais à soma dos individuais. Quando o efeito combinado entre as substâncias é superior aos efeitos individuais, é chamado de sinergismo. Contrariamente, o antagonismo é verificado quando o efeito em conjunto é inferior ao aplicado individualmente, e aquele em que há ausência da interação é chamado de efeito indiferente. Em vista disso, os efeitos da ação antimicrobiana têm influência de alguns fatores, entre eles o tipo de OE, do microrganismo e o método utilizado para avaliação (TARIQ *et al.*, 2019).

Embora não exista um teste padronizado para avaliar a atividade antimicrobiana de OEs, muitos pesquisadores empregam os métodos da CLSI (Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais) para analisar o efeito inibitório ou bactericida. A Concentração Mínima Inibitória (CMI) é utilizada para definir qual a menor concentração da substância que inibe o crescimento do microrganismo teste, da mesma forma que a Concentração Mínima Bactericida (CMB) é empregada para determinar a menor concentração que causa a morte do microrganismo. Entre os métodos *in vitro* geralmente empregados, incluem difusão em disco, diluição e time-kill (RAO; CHEN; MCCLEMENTS, 2019).

O efeito antimicrobiano dos OEs foi investigado ao longo dos anos sobre uma ampla gama de microrganismos. No entanto, o mecanismo de ação ainda não foi totalmente elucidado,

mas sabe-se que a concentração e a composição química do OE são os principais fatores que influenciam na inibição ou morte microbiana. A atividade antibacteriana de um OE pode ter mais que um mecanismo de ação, uma vez que os constituintes possuem diferentes alvos celulares, o que torna difícil prever a suscetibilidade dos microrganismos. No entanto, sabe-se que os principais alvos celulares são a parede celular, a membrana do citoplasma e as proteínas da membrana (Figura 11) (BURT, 2004; SIROLI *et al.*, 2015).

Figura 11 – Mecanismos de ação dos óleos essenciais.



Fonte: Pateiro *et al.*, 2021.

Baseado na propriedade lipofílica dos OEs, foram propostos alguns mecanismos para compreender a ação antimicrobiana. Baseando-se nessas pesquisas, observou-se que os OEs têm a capacidade de penetrar a membrana externa e a membrana citoplasmática das bactérias, tornando a célula mais permeável. Também foi verificada a redução da Força Protón Motiva

(FPM) e conseqüentemente, a síntese de ATP (adenosina trifosfato). A FPM é gerada por meio das reações de transporte de elétrons, formada pela junção do potencial eletroquímico e o gradiente de pH. Aliado a isso, observou-se a liberação dos constituintes intracelulares, resultando na morte celular (Figura 11) (MADIGAN *et al.*, 2016; BHAVANIRAMYA *et al.*, 2019).

As células microbianas desenvolvem mecanismos de autodefesa quando expostas a concentrações baixas ou subletais de OEs. A resposta adaptativa depende principalmente da espécie e, dentre as estratégias realizadas, incluem a alteração da saturação de ácidos graxos, bem como o comprimento da cadeia de carbono, a posição de ramificação, a isomerização *cis/trans* e a conversão de ácidos graxos insaturados em ciclopropanos (DI PASQUA *et al.*, 2007; SIROLI *et al.*, 2015).

As bactérias Gram-negativas naturalmente são mais resistentes à ação dos OEs devido à presença de uma membrana externa na parede celular. Além de não conter essa membrana, as bactérias Gram-positivas também não possuem periplasma, fluido similar a um gel que contém enzimas de degradação e proteínas de transporte. Entretanto, são mais resistentes aos danos mecânicos, pois contêm muitas camadas de peptidoglicana e ácidos teicoicos. Apesar disso, a membrana externa das Gram-negativas é composta por lipopolissacarídeos, lipoproteínas e fosfolipídios, o que permite desenvolver alguns mecanismos de defesa contra antibióticos, entre eles a penicilina. Dessa forma, o mecanismo de ação de OEs em bactérias Gram-negativa é diferente do que em bactérias Gram-positivas (NAZZARO *et al.*, 2013; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017). A Figura 12 ilustra a estrutura da parede celular bacteriana.

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) representam um grande problema de saúde pública em todo o mundo (AL-MOHAIHEF *et al.*, 2020). Hoffmann *et al.* (2017) relataram que as ITA causaram 600 milhões de doenças e 420.000 mortes no mundo durante o ano de 2010. Riley (2020) e Scallan *et al.* (2011) mostram que, de acordo com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), as DTA são consideradas as principais causas de doenças nos Estados Unidos, onde foram registrados cerca de 9,4 milhões de casos, aproximadamente 60.000 hospitalizações e 1400 óbitos. Em escala global, as DTA são comparáveis com as principais doenças infecciosas, entre elas a AIDS, tuberculose e malária (HAVELAAR *et al.*, 2015).

Além da capacidade de adquirir resistência aos antimicrobianos, algumas cepas da espécie *S. aureus* também apresentam o potencial de produzir toxinas que afetam o trato gastrointestinal, denominadas de enterotoxinas. Fetsch *et al.*, (2014) citam que a intoxicação alimentar é causada pela ingestão de alimentos com a toxina pré-formada. Provavelmente, esses alimentos foram contaminados pelo manuseio e armazenamento inadequados. Entre as diversas enterotoxinas produzidas, as cinco responsáveis por 95% dos casos de intoxicação alimentar são as dos tipos A, B, C, D e E, sendo o sorotipo A a principal causa (CAI *et al.*, 2020). Jay (2005) relata que a virulência das cepas de *S. aureus* esteja relacionada com a produção da enzima coagulase e termonuclease (Tnase), por isso, são conhecidas como bactérias coagulases positivas.

Escherichia coli é uma bactéria Gram-negativa pertencente à família das *Enterobacteriaceae*. São microrganismos caracterizados morfológicamente como bastonetes retos que se locomovem devido à presença de flagelos peritríqueos. Apresentam metabolismo anaeróbico facultativo e sem a formação de esporos. É considerado um microrganismo entérico encontrado naturalmente no trato intestinal de animais de sangue quente. Por essa maneira, a presença de *E. coli* nos alimentos e na água é um indicativo de más condições higiênicas (SHIN; WHON; BAE, 2015, AIJUKA; BUYS, 2019).

São poucas linhagens de *E. coli* que são potenciais patógenos transmitidos por alimentos. No entanto, algumas linhagens são consideradas patógenos intestinais e são capazes de produzir enterotoxinas. São divididas em quatro grupos de virulência, classificadas de acordo com a infecção e a produção de toxina, sendo elas: enterohemorrágica (EHEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatogênica (EPEC) e enterotoxigênica (ETEC). O sintoma mais comum da infecção em todos os grupos é o surgimento de diarreias, e no caso da EHEC e EIEC, podem apresentar diarreia sanguinolenta. Todas são produtoras de enterotoxinas, com exceção da EPEC. Dentre os alimentos normalmente contaminados por *E. coli*, destacam-se principalmente as carnes mal cozidas, vegetais folhosos, frutas frescas, derivados lácteos e a água (MADIGAN *et al.*, 2016).

A resistência microbiana na área médica, veterinária e na agricultura, vem estimulando o desenvolvimento de fármacos e agroquímicos provenientes de fontes naturais. Assim, algumas pesquisas são direcionadas no estudo de microrganismos capazes de produzir substâncias antimicrobianas, denominadas de antibióticos. No entanto, a utilização desses agentes é limitada devido à sua toxicidade. O cientista Paul Ehrlich, pioneiro em estudos com fármacos antimicrobianos, desenvolveu um conceito sobre a toxicidade seletiva de produtos naturais, os

quais deveriam inibir ou eliminar microrganismos patogênicos sem ocasionar efeitos adversos no hospedeiro. A penicilina é um exemplo de antibiótico natural produzido pelo fungo *Penicillium chrysogenum*. A descoberta da penicilina marca o início da produção em larga escala de antibióticos com utilidade clínica. Atualmente, vários derivados foram desenvolvidos para aumentar a eficiência e constituem uma classe de antibióticos denominados de β -lactâmicos (MADIGAN *et al.*, 2016).

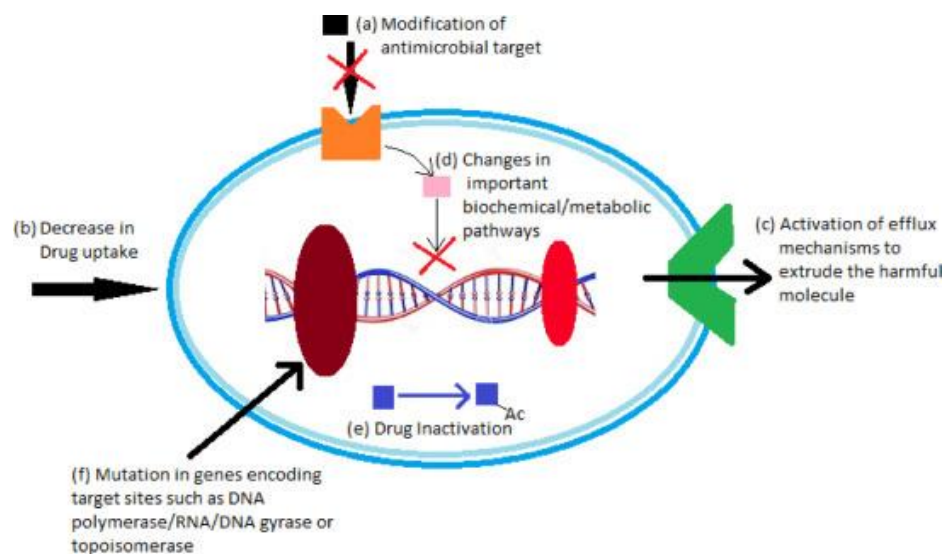
Alguns microrganismos adquirem resistência a antibióticos devido à síntese de genes que originam mutações aleatórias. A disseminação desses genes ocorre por transferência gênica horizontal, por processos de conjugação, transdução e transformação. Uma vez adquirida, as mutações são transmitidas por reprodução e a progênie passa a conter as características genéticas dos microrganismos parentais. A alta taxa de reprodução favorece que toda a população bacteriana em um curto período de tempo passe a ter resistência ao novo antibiótico (LERMINIAUX; CAMERON, 2019; WU *et al.*, 2020).

As células bacterianas, além de conter cromossomos, possuem pequenas moléculas de DNA de fita dupla, que são autorreplicantes e circulares. Essas moléculas são denominadas de plasmídeos. Embora os plasmídeos não sejam essenciais para o crescimento bacteriano, em certas condições ambientais, os genes transportados conferem a sobrevivência e o desenvolvimento das células. Uma vez transportados, esses genes podem codificar proteínas que aumentam a patogenicidade de uma bactéria, como em algumas cepas de *Escherichia coli* e também na produção de toxinas, incluindo a toxina esfoliativa de *Staphylococcus aureus* e a neurotoxina de *Clostridium tetani*. A resistência de antibióticos, metais pesados e a produção de toxina de um microrganismo são atribuídos pelo plasmídeo denominado de fator R. Normalmente os fatores R contêm dois grupos de genes, sendo eles: o fator de transferência de resistência (FTR) e determinante-r. O FTR contém genes para a replicação do plasmídeo e conjugação; já o determinante-r é responsável por codificar enzimas que inativam os antibióticos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017; LERMINIAUX; CAMERON, 2019; WANG *et al.*, 2020a).

O mecanismo de resistência bacteriana é atribuído pela estrutura da célula e as vias metabólicas. Em vista disso, os fármacos antimicrobianos são classificados de acordo com seu mecanismo de ação, estrutura molecular e espectro da ação antimicrobiana. Algumas bactérias têm a capacidade de produzir enzimas que modificam e inativam grupos de antibióticos, como as β -lactamases, conferindo resistência para as penicilinas, cefalosporinas e os carbapenêmicos. As

bactérias Gram-negativas naturalmente são mais resistentes, pois possuem uma membrana externa. Esse grupo de bactéria também possui a capacidade de expelir antibióticos, agindo como bombas de efluxo. Esse mecanismo confere resistência principalmente aos antibióticos do tipo tetraciclina. Também são observadas alterações no sítio alvo da droga devido à inibição da síntese proteica, como aos grupos de aminoglicosídeos, tetraciclinas e macrolídeos. É importante salientar que é esse mecanismo pelo qual *Staphylococcus aureus* é resistente à meticilina (MRSA – *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*) (PÉREZ *et al.*, 2020; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017). Na Figura 13, estão representados os mecanismos de resistência bacteriana comentado anteriormente.

Figura 13 – Mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos.



Fonte: Cla *et al.*, 2021.

Nos últimos anos, a resistência microbiana tornou-se um problema de saúde pública e segurança alimentar. Estima-se que, em 2050, o número de mortes por infecções bacterianas exceda às de câncer. Segundo uma lista publicada em 2017 pela Organização Mundial de Saúde (OMS), existe onze espécies de bactérias consideradas ameaças à saúde humana, entre elas *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, resistentes à vancomicina e carbapenêmico, respectivamente. Em vista disso, estudos devem ser realizados a fim de investigar o mecanismo de ação de produtos antimicrobianos em bactérias de interesse clínico e alimentar (O'NEILL, 2014; TACCONELLI; MAGRINI, 2017).

4.1.3 Atividade Fungicida

O mecanismo de ação da atividade antifúngica dos OEs está baseado principalmente na inibição da síntese do ergosterol. O ergosterol é o principal esteroide das membranas celulares de fungos, o qual é responsável por manter a fluidez da membrana, o crescimento celular e a permeabilidade catiônica (NURIKA; EASTWOOD; BARKER, 2018). Está presente em duas formas, a livre e a esterificada, sendo que a quantidade de cada forma varia de acordo com a espécie fúngica. O ergosterol livre é sintetizado com o objetivo de manter a integridade celular e contribuir para várias funções fisiológicas. Já o esterificado tem a função de fornecer ergosterol, uma vez que é uma forma de armazenamento inerte de esteróides (YUAN *et al.*, 2007). Dessa forma, a inibição da via biossintética do ergosterol é um dos mecanismos de ação de agentes antifúngicos. Também foi observado que os OEs têm o efeito de inibir enzimas, entre elas a ATPase, o que resulta na diminuição dos níveis de ATP intracelular e nas funções metabólicas. Além disso, foi verificada a inibição das enzimas succinato desidrogenase e malato desidrogenase, ambas participam do ciclo do ácido cítrico. Enzimas envolvidas na síntese de micotoxinas também são inibidas pelos OEs, devido ao controle da expressão de genes biossintéticos (HU *et al.*, 2017). Alguns desses mecanismos foram avaliados no estudo de Brandão *et al.*, 2020, cujos autores confirmaram que o OE *Eremanthus erythropappus* foi capaz de inibir a biossíntese do ergosterol e causar danos à integridade da membrana celular fúngica de três espécies de *Aspergillus*, bem como foi capaz de inibir a produção da ocratoxina A.

Os fungos são microrganismos eucariontes, heterotróficos, multicelulares (filamentosos) ou unicelulares (leveduras), aeróbicos ou anaeróbicos facultativos, com reprodução sexuada ou assexuada e nutrição por absorção de matéria orgânica presente no ambiente. Os fungos filamentosos são conhecidos por bolores e são capazes de formar micélios, os quais são constituídos por filamentos de hifas. Dependendo do crescimento, o micélio pode ser visível em alguns alimentos, como no pão e em algumas frutas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

4.1.3.1 Micotoxinas

Apesar de poucas espécies de fungos causarem doenças, existem algumas linhagens produtoras de micotoxinas, metabólitos secundários tóxicos que são produzidos sob certas

condições climáticas (CHEN *et al.*, 2016). Esses metabólitos não apresentam uma função estabelecida no metabolismo e normalmente são sintetizados quando os fungos atingem a maturidade. São moléculas orgânicas que contêm estruturas que variam de anéis heterocíclicos simples a conjugados. Cientificamente, já foi publicada a presença de mais de 400 micotoxinas, produzidas por mais de 100 fungos, sendo a contaminação propriamente dita ocorrendo de duas formas distintas: a primeira considerada como direta, é caracterizada quando os alimentos ou a ração são contaminados com o fungo toxigênico e com a subsequente produção da micotoxina, já para a forma indireta, os alimentos ou a ração foram anteriormente contaminados com o fungo toxigênico, e mesmo após a sua morte, as micotoxinas estão presentes no produto final (LUO; LIU; LI, 2018; ROCHA *et al.*, 2014).

Entre as micotoxinas que podem contaminar os produtos agrícolas estão as aflatoxinas, ocratoxinas, fumonisinas, patulina, zearalenona e tricotecenos (LUO; LIU; LI, 2018). Na literatura, são relatados que os principais efeitos adversos à saúde humana e dos animais ocasionados pelas micotoxinas são a carcinogenicidade, mutagenicidade, neurotoxicidade, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, efeitos estrogênicos e imunossupressores (CHEN *et al.*, 2016; ROCHA *et al.*, 2014). A manifestação da doença irá depender do tipo de micotoxina, da concentração e a frequência da exposição (aguda ou crônica), bem como o sexo, a idade e a saúde do indivíduo. A toxicidade aguda é caracterizada por uma resposta tóxica rápida, enquanto a toxicidade crônica ocorre pela longa exposição a baixas doses do agente, tendo-se como consequência efeitos geralmente irreversíveis e cânceres (RUYCK *et al.*, 2015).

A estrutura química da maioria das micotoxinas permite a conversão dessas substâncias em compostos lipossolúveis, o que facilita uma melhor absorção do local de exposição (trato gastrointestinal ou respiratório) até a corrente sanguínea, onde pode ser distribuída por todo o corpo e atingir diferentes órgãos. À medida que as micotoxinas entram nas células humanas e de animais, há uma grande tendência de atingir o genoma celular, causando uma alteração na sequência de nucleotídeos, o que possibilita o desenvolvimento de câncer, já que esse defeito irá ser transcrito e traduzido (ADAM *et al.*, 2017). O quadro 1 ilustra a classificação das micotoxinas pelo programa de avaliação de monografias da IARC (International Agency for Research on Cancer).

Quadro 1– Classificação das micotoxinas quanto à sua carcinogenicidade.

Classificação	Micotoxina
Grupo 1	Aflatoxinas (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 e AFM1)
Grupo 2B	Ocratoxina (OTA) Fumonisina (FB1 e FB2)
Grupo 3	Tricoteceno, Zearalenona e Patulina

Legenda: Grupo 1: Cancerígeno para os seres humanos; Grupo 2: Possivelmente cancerígeno para os seres humanos; Grupo 3: Não classificável quanto à sua carcinogenicidade para os seres humanos. Fonte: Claeys *et al.*, 2020.

A ocratoxina A é uma micotoxina produzida pelo gênero *Aspergillus*, principalmente pelas espécies *A. carbonarius* e *A. ochareus*. O fungo *A. carbonarius* é pertencente à seção *Nigri*, caracterizado por conter conídeos pretos, com uma temperatura ótima de crescimento em torno de 32 a 35 °C. Diversos produtos vegetais podem ser contaminados por essa espécie, entre elas o cacau, café, amendoim, especiarias, uva e vinhos. A cultura da uva e seus derivados são considerados as principais fontes de contaminação de ocratoxina A por essa espécie (IOANNIDS *et al.*, 2015). Já o fungo *A. ochareus* é pertencente à seção *Circumdati*, com uma temperatura ótima de crescimento em torno de 30°C, tendo-se o café uma das culturas mais susceptíveis à contaminação de *A. ochareus* e produção de ocratoxina A (DAS NEVES *et al.*, 2020; REZENDE *et al.*, 2013).

4.1.4 Radicais Livres e Atividade Antioxidante

As reações de oxidação e redução estão presentes naturalmente em organismos vivos e nos alimentos. Em processos fisiológicos, o equilíbrio redox é necessário para manter o funcionamento celular normal (MENG *et al.*, 2017). Durante o metabolismo aeróbico, ocorre a formação de espécies altamente reativas, denominadas de radicais livres. Esses intermediários possuem deficiência eletrônica e tem a capacidade de abstrair elétron de outra molécula, o que eventualmente ocasiona uma sequência de reações oxidativas. Apesar de serem essenciais para o metabolismo de organismos vivos, em excesso, os radicais livres podem interagir com macromoléculas e contribuir para o desenvolvimento de doenças, como o câncer, doenças neurodegenerativas e o envelhecimento (LIU, 2020). O estresse oxidativo é caracterizado pelo

desequilíbrio entre a produção de radicais livres e os mecanismos antioxidantes (PEÑA-BAUTISTA *et al.*, 2019).

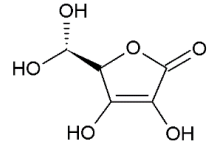
O excesso de radicais livres também causa efeitos negativos para a indústria de alimentos, uma vez que essas espécies reagem com ácidos graxos insaturados causando a oxidação lipídica. Essa reação reduz a qualidade nutricional e sensorial dos alimentos, como também leva à formação de compostos prejudiciais à saúde, como o malonaldeído (LORENZO *et al.*, 2014).

De acordo com a composição, os radicais livres podem ser classificados como orgânicos ou inorgânicos, dependendo de qual elemento os elétrons desemparelhados estejam centrados. Aqueles ligados ao oxigênio são conhecidos como espécies reativas de oxigênio (ERO), sendo elas: o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxila (OH^{\cdot}), alcóxila (RO^{\cdot}) e peróxila (ROO^{\cdot}). Também podem formar as espécies reativas de nitrogênio (ERN), entre elas o óxido nítrico (NO^{\cdot}) e radicais centrados de enxofre, como o sulfanilo (HS^{\cdot}) (WANG *et al.*, 2020b).

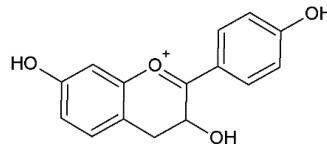
O antioxidante pode ser definido como uma substância, que quando em baixas concentrações, é capaz de inibir a oxidação de um substrato (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). São agentes químicos ou enzimáticos que neutralizam ou evitam a formação dos radicais livres. São classificados de acordo com sua função (sequestradores de radicais livres e de agentes oxidantes não radicalares; substâncias que inibem a formação de compostos oxidantes; agentes quelantes de metais de transição e substâncias capazes de estimular a produção de antioxidantes endógenos), com a polaridade (hidrossolúvel e lipossolúvel) e com a fonte (endógena e exógena). O mecanismo da capacidade antioxidante está baseado na transferência de átomos de hidrogênios ou de elétrons, bem como a ação quelante com os metais de transição (GRANATO *et al.*, 2018). Em vista disso, a eficiência de um antioxidante depende da sua estrutura química, como o número e a posição dos grupamentos hidroxilas, que estão ligados ao anel benzeno e à posição dos substituintes em relação aos grupos hidroxilas (GE *et al.*, 2020).

Entre as principais enzimas antioxidantes, estão a superóxido dismutase, catalase e a glutatona peroxidase. Além dessas enzimas, os antioxidantes também são encontrados nos vegetais e em plantas, como os compostos fenólicos (pelargonidina), carotenoides (licopeno) e nas vitaminas E (α -Tocoferol) e C (ácido ascórbico), sendo conhecidos como antioxidantes naturais (Figura 14) (GONUL *et al.*, 2016; GRANATO *et al.*, 2018).

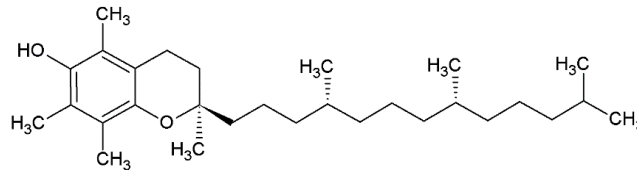
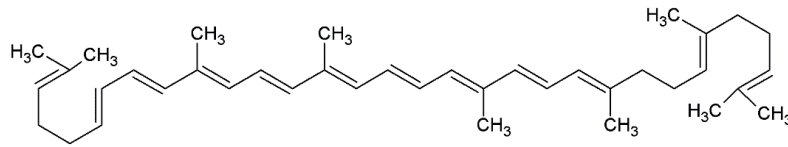
Figura 14 – Estruturas químicas dos antioxidantes naturais.



Ácido ascórbico



Pelargonidina

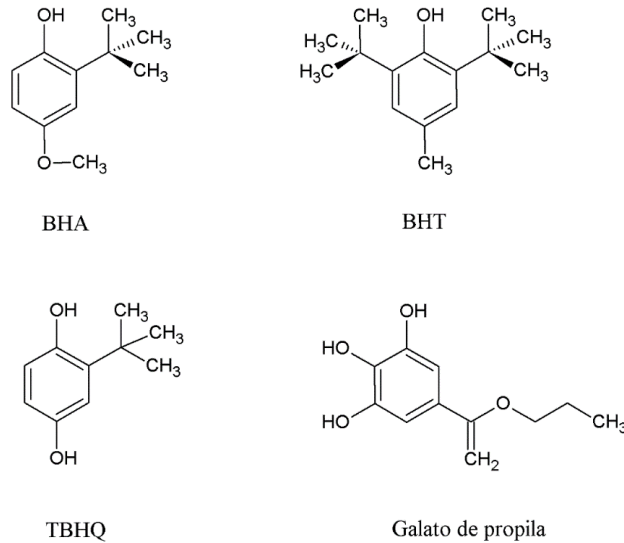
 α -Tocoferol

Licopeno

Fonte: Autor, 2020.

Os grupos hidroxilas ligados ao anel aromático e/ou hidrogênios alílicos, bem como à deslocalização eletrônica oriundas das duplas ligações, possibilitam a atividade dos antioxidantes naturais (FIDELIS *et al.*, 2018; ZIELINSKI, *et al.*, 2014). Essas características também estão presentes nos constituintes químicos dos óleos essenciais, como o eugenol, timol e carvacrol. A importância do desenvolvimento de antioxidantes a partir de fontes naturais é explicada, devido aos resultados dos estudos toxicológicos e do efeito carcinogênico *in vivo* dos antioxidantes sintéticos amplamente empregados pela indústria. Entre essas substâncias, destacam-se: butil-hidroxi-anisol (BHA), 2,6-di-tert-butil-4-hidroxitolueno (BHT), tert-butilhidroquinona (TBHQ) e galato de propila (PG) (DA CRUZ *et al.*, 2019; YANG *et al.*, 2018; ESKANDANI; HAMISHEHKAR; DOLATABADI, 2014). Na figura 15 estão ilustradas as estruturas químicas dos respectivos antioxidantes sintéticos.

Figura 15 – Estruturas químicas dos antioxidantes sintéticos.



Fonte: Autor, 2020.

Existem diversas técnicas para avaliar a atividade antioxidante *in vitro*. Entre esses métodos, destacam-se aqueles capazes de neutralizar radicais (ABTS, DPPH e hidroxila) e inibir a peroxidação lipídica de um substrato (espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), sistema β -caroteno/ácido linoleico e lipossomas). Dependendo da metodologia, uma substância pode ou não apresentar atividade, em razão da complexidade dos processos de oxidação. Um método isolado não é capaz de fornecer um perfil antioxidante completo de uma espécie vegetal e de seus constituintes (NILE *et al.*, 2017). Para os OEs, a insolubilidade em água e as estruturas químicas dos seus constituintes são os fatores que influenciam na escolha do método. Os principais ensaios colorimétricos empregados estão citados abaixo.

A neutralização do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) ocorre por meio da transferência de átomos de hidrogênios ou elétrons da substância antioxidante para o radical. Nessa reação, há uma mudança de coloração (púrpura ao amarelo) devido à redução do radical (SCHAICH; TIAN; XIE, 2015). A estabilização do radical ABTS (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) também ocorre através da doação de átomos de hidrogênios, formando um complexo esverdeado na presença de persulfato de potássio (RE *et al.*, 1999).

Além desses métodos, a determinação da atividade antioxidante também pode ser realizada pela capacidade de complexação de metais, como ocorre no teste do fosfomolibdênio, o qual fundamenta-se na redução do molibdênio (VI) a molibdênio (V) na presença de uma

substância antioxidante. Em meio ácido, essa reação forma um complexo de coloração verde entre fosfato e molibdênio (V) e podem ser determinados por espectrofotometria a 695 nm, de forma que o aumento dos valores de absorvância indica altas atividades antioxidantes (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999).

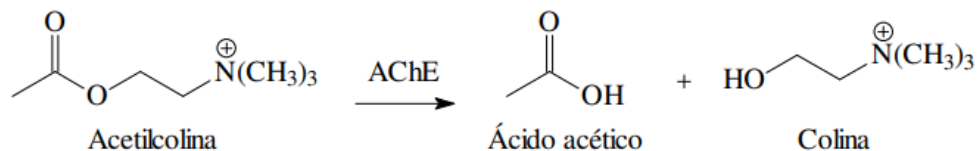
Existem alguns métodos utilizados para inibir a oxidação de um substrato lipídico. A peroxidação lipídica é um processo caracterizado pela interação entre as espécies reativas de oxigênio com ácidos graxos insaturados, o que eventualmente ocasiona a formação de compostos altamente reativos. Esse processo ocorre por meio de reações em cadeia em três etapas sucessivas, sendo elas a iniciação, propagação e terminação. Os radicais livres formados na etapa de iniciação reagem com outras moléculas, formando radicais lipídicos. Essas substâncias reagem com o oxigênio, formando radicais hidroxilas (propagação), os quais atacam as moléculas de ácidos graxos, formando hidroperóxidos lipídicos. A decomposição desses últimos compostos formam intermediários que são prejudiciais à saúde e causa a redução da qualidade nutricional e sensorial nos alimentos (finalização) (REED, 2011; FARHOOSH, 2020).

O ácido tiobarbitúrico (TBARS) reage com moléculas de malonaldeído (produtos da decomposição dos hidroperóxidos, formados após o ataque na porção lipídica da gema de ovo), formando um complexo de coloração rósea que pode ser quantificado a 535 nm (GHANI *et al.*, 2017). Outro teste também utilizado é o sistema β -caroteno/ácido linoleico, por meio desse método, é possível avaliar a capacidade de uma substância em proteger a oxidação do β -caroteno, uma vez que, na ausência de um antioxidante, a cor alaranjada é rapidamente degradada em consequência do ataque dos radicais livres nas insaturações da molécula do β -caroteno. Esses radicais são formados pela perda de um próton de um grupo metileno do ácido linoleico (ALVES *et al.*, 2010). O ensaio de lipossoma por sua vez, é utilizado como um método para avaliar a atividade antioxidante devido à sua semelhança com a membrana biológica, em vista disso, tem-se como objetivo avaliar a capacidade do OE em adentrar nessa membrana e atuar como antioxidante (Reparar os danos oxidativos). Isso ocorre devido à capacidade de encapsulação e a permeabilidade seletiva dos lipossomas, os quais são vesículas nanométricas rodeadas por camadas de fosfolipídios (WANG; ZHU; NIE, 2021).

4.1.5 Atividade Anticolinesterásica

Nas vias colinérgicas dos sistemas nervoso central e periférico, a acetilcolinesterase (AChE) é a enzima responsável por catalisar a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) (Figura 16). A ACh tem como função a propagação do impulso elétrico de um neurônio a outro. Dessa forma, a AChE atua diretamente na transmissão dos impulsos nervosos. Sabe-se que a inibição da AChE é um dos alvos para o tratamento de doenças neurodegenerativas, como a de Alzheimer e Parkinson, isso porque os inibidores impedem a degradação da ACh, assim, há o aumento do nível e a duração do neurotransmissor na fenda sináptica, intensificando a neurotransmissão colinérgica (BARBOSA *et al.*, 2020).

Figura 16 – Hidrólise da acetilcolina catalisada pela enzima acetilcolinesterase.



Fonte: Autor, 2021.

As substâncias que possuem a capacidade de inibir a AChE são conhecidas como anticolinesterásicas e são utilizadas em casos com baixos níveis de ACh. No entanto, deve haver um equilíbrio entre enzima e neurotransmissor, uma vez que o acúmulo de ACh também pode levar ao aparecimento de algumas patologias, entre elas as doenças neurais. Isso pode ser explicado devido à superestimulação dos receptores desse neurotransmissor nas sinapses. Além disso, a intoxicação causada por pesticidas pertencentes às classes dos carbamatos e organofosforados também é gerada pela inibição da AChE e tem-se como tratamento o uso de reativadores dessa enzima. Para os invertebrados, a inibição da AChE gera o acúmulo de ACh em níveis tóxicos, ocasionando a morte. Diante disso, há um crescente interesse pela avaliação de compostos que apresentam atividades de inibição ou reativação da AChE (ARAÚJO; SANTOS; GONÇALVES, 2016; KHAN *et al.*, 2018).

Para evitar a degradação da acetilcolina e aumentar a neurotransmissão colinérgica, estão sendo avaliados metabólitos secundários de plantas como possíveis inibidores da

acetilcolinesterase. Isso porque os fármacos que são utilizados podem apresentar efeitos adversos, como hepatotoxicidade, distúrbios gastrointestinais, insônia, fadiga, síncope e bradicardia. Os OEs têm se mostrado como uma importante fonte de substâncias bioativas, que podem ser utilizados para diminuir o risco de doenças, incluindo o Alzheimer. Sugere-se que a inibição da acetilcolinesterase ocorre porque os constituintes dos OEs são capazes de interagir com o sítio ativo da enzima. Dessa forma, o neurotransmissor permanece ativo por um período maior na fenda sináptica, melhorando assim, a transmissão colinérgica (DE OLIVEIRA *et al.*, 2019).

3. CONCLUSÃO

O constituinte majoritário quantificado do óleo essencial de *Allium sativum* foi o trissulfeto dialila. Esse óleo essencial foi eficiente no controle do crescimento dos fungos micotoxigênicos, como também foi capaz de diminuir a atividade da enzima acetilcolinesterase, podendo ser considerado um agente nas formulações de sanitizantes, fármacos e agroquímicos. No caso dos óleos essenciais de *Coriandrum sativum* e *Anethum graveolens*, os constituintes majoritários identificados e quantificados foram o linalol e a carvona, respectivamente. Ambos os óleos apresentaram efeitos antimicrobianos, e nos ensaios antioxidantes, das espécies reativas do ácido tiobarbitúrico e na redução do complexo fosfomolibdênio, o óleo essencial de *C. sativum* obteve o melhor resultado. Assim, estudos *in vivo* devem ser realizados, para comprovar tais propriedades biológicas, como também utilizar novas tecnologias, entre elas a nanotecnologia.

REFERÊNCIAS

- ADAM, M. A. A. *et al.* Effects of different mycotoxins on humans, cell genome and their involvement in cancer. **Oncology reports**, v. 37, n. 3, p. 1321-1336, 2017.
- AIJUKA, M.; BUYS, E. M. Persistence of foodborne diarrheagenic *Escherichia coli* in the agricultural and food production environment: Implications for food safety and public health. **Food microbiology**, v. 82, p. 363-370, 2019.
- AL-MOHAITHEF, M. *et al.* Assessment of foodborne illness awareness and preferred information sources among students in Saudi Arabia: A cross-sectional study. **Food Control**, v. 112, 2020.
- AL-SHEDDI, E. S. *et al.* Evaluation of cytotoxicity, cell cycle arrest and apoptosis induced by *Anethum graveolens* L. essential oil in human hepatocellular carcinoma cell line. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 27, n. 7, p. 1053-1060, 2019.
- ALVES, C. K. *et al.* Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, out. 2010.
- ANDERSSON, D. I.; HUGHES, D.; KUBICEK-SUTHERLAND, J. Z. Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides. **Drug Resistance Updates**, v. 26, p. 43-57, 2016.
- ANGELIDIS, A. S. *et al.* Isolation and characterization of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from milk of dairy goats under low-input farm management in Greece. **Veterinary Microbiology**, v. 247, p. 108749, 2020.
- ARAÚJO, C. R. M.; SANTOS, V. L. A.; GONÇALVES, A. A. Acetilcolinesterase-AchE: Uma Enzima de Interesse Farmacológico. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 6, p. 1818-1834, 2016.
- BAKKALI, F. *et al.* Biological effects of essential oils—a review. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BARBOSA, D. C. da S. *et al.* Chemical composition and acetylcholinesterase inhibitory potential, in silico, of *Myrciaria floribunda* (H. West ex Willd.) O. Berg fruit peel essential oil. **Industrial Crops and Products**, v. 151, p. 112372, 2020.
- BASANISI, M. G. *et al.* Genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from milk and dairy products in South Italy. **Food microbiology**, v. 62, p. 141-146, 2017.
- BAZARGANI, M. M.; ROHLOFF, J. Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms. **Food control**, v. 61, p. 156-164, 2016.

- BEHBAHANI, B. A.; FOOLADI, A. A. I. Evaluation of phytochemical analysis and antimicrobial activities *Allium* essential oil against the growth of some microbial pathogens. **Microbial pathogenesis**, v. 114, p. 299-303, 2018.
- BHAVANIRAMYA, S. *et al.* Role of essential oils in food safety: Antimicrobial and antioxidant applications. **Grain & Oil Science and Technology**, v. 2, p. 49-55, 2019.
- BISEN, S. P.; EMERALD, M. Nutritional and therapeutic potential of garlic and onion (*Allium* sp). **Current Nutrition & Food Science**, v. 12, n. 3, p. 190-199, 2016.
- BRANDÃO, R. M. *et al.* Antifungal and antimycotoxigenic effect of the essential oil of *Eremanthus erythropappus* on three different *Aspergillus* species. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 35, n. 5, p. 524-533, 2020.
- BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists**. 2 ed., Editora: John Wiley & Sons, 2015. 1280 p.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International journal of food microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.
- CAI, H. *et al.* Prevalence and characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from Kazak cheese in Xinjiang, China. **Food Control**, p. 107759, 2020.
- CARUSO, M. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in sheep and goat bulk tank milk from Southern Italy. **Small Ruminant Research**, v. 135, p. 26-31, 2016.
- CHEN, Y. *et al.* Development and optimization of a multiplex lateral flow immunoassay for the simultaneous determination of three mycotoxins in corn, rice and peanut. **Food chemistry**, v. 213, p. 478-484, 2016.
- CLAEYS, L. *et al.* Mycotoxin exposure and human cancer risk: A systematic review of epidemiological studies. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 4, p. 1449-1464, 2020.
- CORDOVANI, B. Como plantar coentro, a planta que desperta amor e ódio. Disponível em: <<https://casavogue.globo.com/Arquitetura/Paisagismo/noticia/2020/11/como-plantar-coentro-planta-que-desperta-amor-e-odio.html>>. Acesso em 20 de setembro de 2021.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, p. 3670-3695, 2013.
- DA CRUZ, R. G. *et al.* Comparison of the antioxidant property of acerola extracts with synthetic antioxidants using an in vivo method with yeasts. **Food chemistry**, v. 277, p. 698-705, 2019.

DAS NEVES, T. T. *et al.* Simulation of coffee beans contamination by *Aspergillus* species under different environmental conditions and the biocontrol effect by *Saccharomyces cerevisiae*. **LWT**, v. 148, p. 111610, 2020.

DE OLIVEIRA, M. S. *et al.* Phytochemical profile, antioxidant activity, inhibition of acetylcholinesterase and interaction mechanism of the major components of the *Piper divaricatum* essential oil obtained by supercritical CO₂. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 145, p. 74-84, 2019.

DI PASQUA, R. *et al.* Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 12, p. 4863-4870, 2007.

ESKANDANI, M.; HAMISHEHKAR, H.; DOLATABADI, J. E. N. Cytotoxicity and DNA damage properties of tert-butylhydroquinone (TBHQ) food additive. **Food chemistry**, v. 153, p.315-320, 2014.

FARHOOSH, R. Critical kinetic parameters and rate constants representing lipid peroxidation as affected by temperature. **Food Chemistry**, 2020.

FETSCH, A. *et al.* *Staphylococcus aureus* food-poisoning outbreak associated with the consumption of ice-cream. **International journal of food microbiology**, v. 187, p. 1-6, 2014.

FIDELIS, M. *et al.* In vitro antioxidant and antihypertensive compounds from camu-camu (*Myrciaria dubia* McVaugh, Myrtaceae) seed coat: A multivariate structure-activity study. **Food and chemical toxicology**, v. 120, p. 479-490, 2018.

GASTÓN, M. S *et al.* Sedative effect of central administration of *Coriandrum sativum* essential oil and its major component linalool in neonatal chicks. **Pharmaceutical biology**, v. 54, n. 10, p. 1954-1961, 2016.

GE, X. *et al.* The phenolic compounds profile, quantitative analysis and antioxidant activity of four naked barley grains with different color. **Food Chemistry**, v. 335, 2020.

GHANI, M. A. *et al.* Measurement of antioxidant activity with the thiobarbituric acid reactive substances assay. **Food chemistry**, v. 230, p. 195-207, 2017.

GONUL, I. *et al.* Methoxy group containing bidentate Schiff base ligands and their transition metal complexes: Synthesis, structural characterisation, photoluminescence, antioxidant capacity and superoxide dismutase activity studies. **Inorganica Chimica Acta**, v. 453, p. 522-530, 2016.

GOODARZI, M. T. *et al.* The role of *Anethum graveolens* L.(Dill) in the management of diabetes. **Journal of tropical medicine**, v. 2016, 2016.

GRANATO, D. *et al.* Antioxidant activity, total phenolics and flavonoids contents: Should we ban in vitro screening methods. **Food Chemistry**, v. 264, p. 471-475, 2018.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and medicine. 4 Ed., Oxford: Oxford University. 2007, 888p.

HAVELAAR, A. H. *et al.* World Health Organization global estimates and regional comparisons of the burden of foodborne disease in 2010. **PloS medicine**, v. 12, n. 12, p. 23, 2015.

HOFFMANN, S. *et al.* Attribution of global foodborne disease to specific foods: Findings from a World Health Organization structured expert elicitation. **PloS One**, v. 12, n. 9, 2017.

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

IOANNIDS, A. G. *et al.* Modelling the influence of temperature, water activity and sodium metabisulphite on the growth and OTA production of *Aspergillus carbonarius* isolated from Greek wine grapes. **Food Microbiology**, v. 49, p. 12-22, Aug. 2015.

JAY, J.M. Microbiologia de Alimentos. 6 ed., Editora: Artmed, 2005. 712 p.

KHAN, H. *et al.* Flavonoids as acetylcholinesterase inhibitors: current therapeutic standing and future prospects. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 2018, 101: 860-870.

LASRAM, S. *et al.* Antifungal and antiaflatoxinogenic activities of *Carum carvi* L., *Coriandrum sativum* L. seed essential oils and their major terpene component against *Aspergillus flavus*. **Industrial crops and products**, v. 134, p. 11-18, 2019.

LERMINIAUX, N. A.; CAMERON, A. D.S. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. **Canadian journal of microbiology**, v. 65, n. 1, p. 34-44, 2019.

LIU, Z. Bridging free radical chemistry with drug discovery: A promising way for finding novel drugs efficiently. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 189, 2020.

LLANA-RUIZ-CABELLO, M. L. R. *et al.* Cytotoxic and mutagenic in vitro assessment of two organosulfur compounds derived from onion to be used in the food industry. **Food chemistry**, v. 166, p. 423-431, 2015.

LORENZO, J. M. *et al.* Effect of fat content on physical, microbial, lipid and protein changes during chill storage of foal liver pâté. **Food chemistry**, v. 155, p. 57-63, 2014.

LUO, Y; LIU, X; LI, J. Updating techniques on controlling mycotoxins-A review. **Food control**, v. 89, p. 123-132, 2018.

MADIGAN, M.Y. *et al.* Microbiologia Brock. 14 Ed., Editora: Artmed, 2016, 1032p.

MANZUOERH, R. *et al.* Effectiveness of topical administration of *Anethum graveolens* essential oil on MRSA-infected wounds. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 109, p. 1650-1658, 2019.

MARCHESE, A. *et al.* Antifungal and antibacterial activities of allicin: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 52, p. 49-56, 2016.

MENG, D. *et al.* Antioxidant activity evaluation of dietary phytochemicals using *Saccharomyces cerevisiae* as a model. **Journal of functional foods**, v. 38, p. 36-44, 2017.

MOHAMMED, F. A. *et al.* *Anethum graveolens* (dill)—A medicinal herb induces apoptosis and cell cycle arrest in HepG2 cell line. **Journal of ethnopharmacology**, v. 219, p. 15-22, 2018.

NAIDU, M. M. *et al.* Effect of drying methods on the quality characteristics of dill (*Anethum graveolens*) greens. **Food Chemistry**, v. 192, p. 849-856, 2016.

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

NICASTRO, H. L.; ROSS, S. A.; MILNER, J. A. Garlic and onions: their cancer prevention properties. **Cancer prevention research**, v. 8, n. 3, p. 181-189, 2015.

NILE, S. H. *et al.* Utilization of quercetin and quercetin glycosides from onion (*Allium cepa* L.) solid waste as an antioxidant, urease and xanthine oxidase inhibitors. **Food chemistry**, v. 235, p.119-126, 2017.

NURIKA, I; EASTWOOD, D. C.; BARKER, G. C. A comparison of ergosterol and PLFA methods for monitoring the growth of ligninolytic fungi during wheat straw solid state cultivation. **Journal of microbiological methods**, v. 148, p. 49-54, 2018.

O'DEA, M. *et al.* Antimicrobial resistance and genomic insights into bovine mastitis-associated *Staphylococcus aureus* in Australia. **Veterinary Microbiology**, v. 250, p. 108850, 2020.

O'NEILL, J. 2014. Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations. The Review on Antimicrobial Resistance, London.

PATEIRO, M. *et al.* Application of essential oils as antimicrobial agents against spoilage and pathogenic microorganisms in meat products. **International journal of food microbiology**, v. 337, 2021.

PATRA, B. *et al.* Transcriptional regulation of secondary metabolite biosynthesis in plants. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1829, n. 11, p. 1236-1247, 2013.

PEÑA-BAUTISTA, C. *et al.* Free radicals in Alzheimer's disease: Lipid peroxidation biomarkers. **Clinica Chimica Acta**, v. 491, p. 85-90, 2019.

PÉREZ, V. K. C. *et al.* Relationship between virulence factors and antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, 2020.

PETROPOULOS, S. *et al.* Antimicrobial and antioxidant properties of various Greek garlic genotypes. **Food chemistry**, v. 245, p. 7-12, 2018.

PICHERSKY, E.; RAGUSO, R. A. Why do plants produce so many terpenoid compounds? **New Phytologist**, v. 220, n. 3, p. 692-702, 2018.

POOJARY, M. M. *et al.* Stability and extraction of bioactive sulfur compounds from *Allium* genus processed by traditional and innovative technologies. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 61, p. 28-39, 2017.

POURZAND, A. *et al.* Associations between Dietary *Allium* Vegetables and Risk of Breast Cancer: A Hospital-Based Matched Case-Control Study. **J Breast Cancer**, v. 19, n. 3 p. 292 - 300, 2016.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 269, n. 2, p. 337-341, May 1999.

PUTNIK, P. *et al.* An overview of organosulfur compounds from *Allium* spp.: From processing and preservation to evaluation of their bioavailability, antimicrobial, and anti-inflammatory properties. **Food chemistry**, v. 276, p. 680-691, 2019.

RAMIREZ, D. A. *et al.* Analytical methods for bioactive sulfur compounds in *Allium*: Na integrated review and future directions. **Journal of food composition and analysis**, v. 61, p. 4-19, 2017.

RAO, J.; CHEN, B.; MCCLEMENTS, D. J. Improving the efficacy of essential oils as antimicrobials in foods: Mechanisms of action. **Annual review of food science and technology**, v. 10, p. 365-387, 2019.

RE, R. *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free radical biology and medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

REED, T. T. Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 7, p. 1302-1319, 2011.

REZENDE, E.F. *et al.* Ochratoxigenic fungi associated with green coffee beans (*Coffea arabica* L.) in conventional and organic cultivation in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 377-384, 2013.

RILEY, L. W. Extraintestinal Foodborne Pathogens. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 11, p. 275-294, 2020.

ROCHA, M. E. B. *et al.* Mycotoxins and their effects on human and animal health. **Food Control**, v. 36, n. 1, p. 159-165, 2014.

RUYCK, K. *et al.* Dietary mycotoxins, co-exposure, and carcinogenesis in humans: Short review. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 766, p. 32-41, 2015.

SALAM, A. M.; QUAVE, C. L. Opportunities for plant natural products in infection control. **Current opinion in microbiology**, v. 45, p. 189-194, 2018.

SALJOUGHIAN, S. *et al.* The effects of food essential oils on cardiovascular diseases: A review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 58, n. 10, p. 1688-1705, 2017.

SCALLAN, E. *et al.* Foodborne illness acquired in the United States – unspecified agents. **Emerging infectious diseases**, v. 17, n. 1, p. 16, 2011.

SCHAICH, K. M; TIAN, X.; XIE, J. Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. **Journal of Functional Foods**, v. 14, p.111-125, 2015.

SCHELIN, J. *et al.* The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. **Virulence**, v. 2, n. 6, p. 580-592, 2011.

SHIN, N. R; WHON, T. W.; BAE, J. W. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. **Trends in biotechnology**, v. 33, n. 9, p. 496-503, 2015.

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

SIMÕES, C.M.O. *et al.* Farmacognosia: do produto natural ao medicamento. Porto Alegre: 2017. 486p.

SIROLI, L. *et al.* Effects of sub-lethal concentrations of thyme and oregano essential oils, carvacrol, thymol, citral and trans-2-hexenal on membrane fatty acid composition and volatile molecule profile of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis*. **Food chemistry**, v. 182, p. 185-192, 2015.

SNOUSSI, M. *et al.* Phytochemical analysis, antimicrobial and antioxidant activities of *Allium roseum* var. *odoratissimum* (Desf.) Coss extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 89, p. 533-542, 2016.

TACCONELLI, E., MAGRINI, N. Global priority list of antibiotic resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. World Health Organization, Geneva. 2017.

TAHERIAN, A. A; VAFAEI, A. A; AMERI, J. Opiate system mediate the antinociceptive effects of *Coriandrum sativum* in mice. **Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR**, v. 11, n. 2, p. 679, 2012.

TARIQ, A. *et al.* A systematic review on ethnomedicines of anti-cancer plants. **Phytotherapy Research**, v. 31, n. 2, p. 202-264, 2017.

- TARIQ, S. *et al.* A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. **Microbial pathogenesis**, v. 134, 2019.
- TIAN, J. *et al.* In vitro and in vivo activity of essential oil from dill (*Anethum graveolens* L.) against fungal spoilage of cherry tomatoes. **Food Control**, v. 22, n. 12, p. 1992-1999, 2011.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B.; CASE, C. L. Microbiologia. 12 Ed., Editora: Artmed, 2017, 964p.
- VANHOLME, B.; EL HOUARI, I.; BOERJAN, W. Bioactivity: phenylpropanoids best kept secret. **Current opinion in biotechnology**, v. 56, p. 156-162, 2019.
- VRANOVA, E.; COMAN, D.; GRUISSEM, W. Network analysis of the MVA and MEP pathways for isoprenoid synthesis. **Annual review of plant biology**, v. 64, p. 665-700, 2013.
- WANG, B.S. *et al.* Anti-inflammatory effects of an aqueous extract of Welsh onion green leaves in mice. **Food chemistry**, v. 138, n. 2-3, p. 751-756, 2013.
- WANG, Q. *et al.* Heavy metal copper accelerates the conjugative transfer of antibiotic resistance genes in freshwater microcosms. **Science of The Total Environment**, v. 717, 2020a.
- WANG, X. Q *et al.* Free radicals for cancer theranostics. **Biomaterials**, v. 266, 2020b.
- WANG, J; ZHU, M; NIE, G. Biomembrane-based nanostructures for cancer targeting and therapy: from synthetic liposomes to natural biomembranes and membrane-vesicles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2021.
- WEI, J. N. *et al.* Phytochemical and bioactive profile of *Coriandrum sativum* L. **Food chemistry**, v. 286, p. 260-267, 2019.
- WIDHALM, J. R.; DUDAREVA, N. A familiar ring to it: biosynthesis of plant benzoic acids. **Molecular plant**, v. 8, n. 1, p. 83-97, 2015.
- WU, H. *et al.* Putative environmental levels of levofloxacin facilitate the dissemination of antibiotic-resistant *Escherichia coli* via plasmid-mediated transformability. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 195, 2020.
- YANG, X. *et al.* Developmental toxicity of synthetic phenolic antioxidants to the early life stage of zebrafish. **Science of the Total Environment**, v. 643, p. 559-568, 2018.
- YUAN, J. P. *et al.* Simultaneous determination of free ergosterol and ergosteryl esters in *Cordyceps sinensis* by HPLC. **Food chemistry**, v. 105, n. 4, p. 1755-1759, 2007.
- ZHAO, X. *et al.* Biofilm formation and control strategies of foodborne pathogens: food safety perspectives. **RSC advances**, v. 7, n. 58, 2017.

ZHOU, F.; PICHERSKY, E. More is better: the diversity of terpene metabolism in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 55, p. 1-10, 2020.

ZIELINSKI, A. A. F. *et al.* A comparative study of the phenolic compounds and the in vitro antioxidant activity of different Brazilian teas using multivariate statistical techniques. **Food Research International**, v. 60, p. 246-254, 2014.

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1 – Chemical characterization and biological activities of the essential oils from *Allium sativum*, *Coriandrum sativum* and *Anethum graveolens*

Artigo redigido nas normas do periódico
Flavour and Fragrance Journal (ISSN:1099-1026)

Ianca Carneiro Ferreira¹, Gabriela Aguiar Campolina¹, Alex Rodrigues Silva Caetano², Cássia Duarte Oliveira¹, Vanuzia Rodrigues Fernandes Ferreira², Luís Roberto Batista¹, David Lee Nelson³ & Maria das Graças Cardoso^{2*}

¹Departamento de Ciência dos alimentos, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, Minas Gerais, Brasil

² Departamento de Química, Universidade Federal (UFLA), Lavras, Minas Gerais, Brasil

³Programa de Pós-graduação em Biocombustíveis, Universidade Federal do Vale do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), Diamantina, Minas Gerais, Brasil

*Autor correspondente

Maria das Graças Cardoso, Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras (UFLA), CEP 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brasil

Email: mcardoso@ufla.br

CHEMICAL CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF THE ESSENTIAL OILS FROM *Allium sativum*, *Coriandrum sativum* AND *Anethum graveolens*

ABSTRACT

Essential oils have received much attention because they contain a variety of terpene and phenylpropanoid compounds that are responsible for their biological activities. The objectives of this work were to analyze the chemical composition, evaluate the antioxidant, anticholinesterase and biological activities of the essential oils from *Allium sativum* (garlic), *Coriandrum sativum* (coriander) and *Anethum graveolens* (dill) against the bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* and against the fungi *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus*. The essential oils were extracted using the hydrodistillation technique and characterized by GC-MS and GC-FID. The principal constituents found were linalool, carvone and diallyl trisulfide in the essential oils from coriander (CEO), dill (EEO) and garlic (AEO), respectively. CEO and EEO were observed to be the most efficient in controlling bacterial growth, and the growth of both fungi was completely inhibited by the essential oil from AEO at all the concentrations tested. For CEO and EEO, a dose-dependent relationship with the concentrations was observed for the antifungal activity. A decrease in acetylcholinesterase activity in the presence of AEO was observed, but no activities were observed in the antioxidant assays. Satisfactory results in the antioxidant assay using thiobarbituric acid (IC_{50}) ($8.02 \mu\text{g mL}^{-1}$) and in the reduction of the phosphomolybdenum complex (0.025 nm) were only observed with the CEO. The AEO shows promise for the development of sanitizers, drugs and agrochemicals.

Keywords: Natural sources, bioactive compounds, spices.

1. INTRODUCTION

Interest in natural sources as alternatives to synthetic chemical products has increased significantly, especially with respect to the essential oils (EOs). The constituents present in EOs include mainly the terpene and phenylpropanoid classes, whose bioactivity depends on the structural configurations of the molecules.¹

Since ancient times, garlic (*Allium sativum*) has been used worldwide in gastronomy and traditional medicine.² Its biological properties are mainly attributed to organosulfur compounds that belong to the thiosulfinate class. However, because of their high instabilities, new compounds rearrange to give rise to a wide variety of sulfur-derived substances, including diallyl disulfide, diallyl sulfide, diallyl trisulfide, methyl allyl trisulfide and diallyl tetrasulfide. The number of sulfur atoms influences the biological potential.^{3,4} Nicastro et al⁵ and Pourzand⁶

reported an association between the decrease in the incidence of cancer of the gastrointestinal tract and breast cancer with the consumption of vegetables of the *Allium* species. Teixeira et al⁷ observed that biodegradable films incorporated with garlic EO exhibited antioxidant and antimicrobial activities. Garcia-Diez et al⁸ used garlic EO in the manufacture of cured sausage and observed a significant reduction in some food-borne pathogens, such as *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*.

In addition to garlic, two spices from the Apiaceae family are known for their pharmacological properties, namely coriander (*Coriandrum sativum*) and dill (*Anethum graveolens*). Linalool is the main constituent of the EO extracted from the coriander seeds. It is considered to be responsible for the biological effects. This effect can be explained by the presence of a hydroxyl group, which makes it chemically reactive.⁹ Duarte et al¹⁰ found that coriander EO and linalool were active against *Campylobacter* bacteria and also interfered with quorum sensing and biofilm formation. Furthermore, it was proven by Das et al¹¹ that the nanoencapsulated EO possessed antifungal, antiaflatoxic and antioxidant activity, as well as being able to inhibit an aflatoxin precursor. Chen et al¹² found important pharmacological properties for the EO from dill, including the ability to induce apoptosis in *Candida albicans*. Teneva et al¹³ reported that the inclusion of the dill EO increased the shelf life of mayonnaise by inhibiting food microorganisms. Among the main constituents of dill EO reported in the literature are carvone, limonene, apiole, thymol and α -pinene.^{14,15}

The use of EOs, which are generally considered safe, is being considered as an alternative for the development of food additives and agrochemicals because some of these products contain compounds that are toxic for humans, animals and the environment. The use of EOs also reduces the risks of selecting insects and microorganisms resistant to synthetic products. Therefore, the application of EOs can lead to a more sustainable agricultural practice as well as guarantee food security.^{16,17,13} Therefore, the EOs of *Allium sativum*, *Coriandrum sativum* and *Anethum graveolens* were characterized, their antimicrobial activities against pathogenic bacteria and mycotoxigenic fungi, their antioxidant capacities and their effects on acetylcholinesterase activity were determined.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Raw material: extraction and chemical characterization of EOs

The dried plant materials were purchased from the local market in the city of Lavras, Minas Gerais, Brazil. The seeds of the *Coriandrum sativum* L. (coriander) and *Anethum graveolens* (dill) and the dehydrated bulbs of *Allium sativum* (garlic) were used.

The extraction of EOs was performed by the hydrodistillation technique using a modified Clevenger apparatus, with an extraction period of two hours.¹⁸ The hydrolate was centrifuged at 9.6g for fifteen minutes, separated with a Pasteur micropipette and placed in an amber glass flask under refrigeration at 4 °C.

The identification of the constituents was performed by gas chromatography using a Shimadzu chromatograph (Model QP 2010 Plus) coupled to a mass spectrometer (GC-MS) and the quantitative analyses were performed using a Shimadzu gas chromatograph (Model GC-2010) equipped with a flame ionization detector (FID). The experimental conditions described by Ferreira et al¹⁹ were followed. The constituents were identified by comparing the retention indexes with those in the literature Adams²⁰ using two NIST107 equipment libraries and the NIST21, by which the mass spectra obtained can be compared with those existing in the libraries.

2.2 Evaluation of antimicrobial activity

The evaluation of antimicrobial activity was performed at the Laboratory of Mycotoxins and Food Mycology of the Department of Food Science (DCA) at UFLA. Two species of pathogenic bacteria *Escherichia coli* (ATCC-EPEP 055) and *Staphylococcus aureus* (ATCC-13565) and two species of mycotoxigenic fungi, *Aspergillus carbonarius* (CCDCA 10507) and *Aspergillus ochraceus* (CCDCA 10490), were used. The microbial species were acquired from the UFLA DCA Microorganisms Culture Collection.

2.2.1 Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Bactericidal Concentration (MBC) and antimicrobial activity by disc diffusion

The bacterial strains were reactivated from standard strains in Brain Heart Infusion (BHI) nutrient broth at 37 °C for 24 hours. After growth, the inoculum was transferred to microtubes (Eppendorf type) with 40% glycerol and kept at freezing temperature. The BHI nutrient broth was used for bacterial subculture and incubated at 37 °C for 24 hours.²¹

The broth microdilution technique was used CLSI (2015)²¹ to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC). Initially, a 100 $\mu\text{L mL}^{-1}$ stock solution of the essential oil was prepared using 0.5% Tween 80 (w/v). A 300 μL aliquot of this dilution was transferred to the first wells; the other wells contained 150 μL of Muller-Hinton medium. Serial dilutions were performed to yield concentrations of 50; 25; 12.5; 6.25; 3.125; 1.565; 0.781 and 0.391 $\mu\text{l ml}^{-1}$. Microdilutions were performed in triplicate. The inoculum was diluted in sterile saline solution (0.9%) until a turbidity corresponding to 0.5 on the McFarland scale ($1 \text{ to } 2 \times 10^8 \text{ CFU mL}^{-1}$) was reached and standardized by spectrophotometry with absorbance values between 0.08 to 0.1. Subsequently, 10 μL of this inoculum was added to the wells. For the negative control, the bacterial suspension was not added; a sterile control of the culture medium (without the bacteria and without the EO) was used. For the positive control, the suspension was inoculated into wells containing the culture medium and Tween 80 (0.5%), but without the EO. The microplates were sealed and incubated at 37 °C for 24 hours. After this period, 20 μL of 0.01% (m/v) resazurin dye was added, and the mixture was observed for 2 hours to detect the change in color of the dye from blue to pink, which indicated that the bacterial metabolism was active.

In the determination of MBC, 10 μL aliquots were removed from each of the wells of the previous analysis and transferred to Petri dishes containing Muller-Hinton agar. Plates were incubated at 37 °C for 24 hours.

The solid medium disk diffusion test was also performed. After the inoculum was standardized at 0.5 on the McFarland scale ($1 \text{ to } 2 \times 10^8 \text{ CFU mL}^{-1}$), 100 μL were added to the surface of the Petri dish containing Muller-Hinton agar and, with the aid of a sterile swab, the suspension was spread until a uniform smear was obtained. After drying the inoculum, 5-mm-diameter filter paper discs were applied, impregnated with 10 μL of pure EO and diluted with Tween 80 at concentrations of 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62, 7.81 and 3.90 $\mu\text{L mL}^{-1}$. The plates were incubated in a BOD at 37 °C for 24 hours and measurements of the diameters of inhibition halos were performed. Analyses were performed in triplicate.²²

2.2.2 Effect of EOs on mycelial growth of mycotoxigenic fungi

The inhibitory effect of EOs on the mycelial growth of filamentous fungi was evaluated according to the method of Caetano et al²³. The fungi were kept on paper discs at -80 °C and reactivated in Malt Extract Agar (MEA) culture medium with the composition (g/L): malt extract (20), peptone (0.1), glucose (20) and agar (15). Plates were incubated at 25 °C for 7 days. The inoculum was prepared using a Neubauer chamber and standardized to 10⁶ spores/mL. Volumes of 30, 20, 10, 5 and 2.5 µL of the EO were added to Petri dishes (15 cm) containing 10 mL of CYA culture medium (Czapeck Yeast Agar) and YES (Yeast Extract Sucrose Agar) for the fungi *A. carbonarius* and *A. ochraceus*, respectively, to yield the final concentrations of 3000, 2000, 1000, 500 and 250 µL⁻¹. Then, 10 µL of the standardized spore suspension was inoculated. Plates containing only the culture medium and the fungus were also prepared. The plates were incubated at 25 °C for seven days in a BOD. All the analyses were performed in triplicate.

2.3 In vitro antioxidant capacity

The in vitro antioxidant capacity (AOX) was evaluated by the neutralization of ABTS [2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] and DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radicals, as well as by the reduction of phosphomolybdenum and the inhibition of lipid peroxidation as measured by the thiobarbituric acid reactive species assays (TBARS), the β-carotene/linoleic acid system and liposomes utilizing the methods described in the literature.^{24,25,26,27,28,29} The EO was diluted in ethanol to yield the final concentrations of 500, 250, 200, 150, 100, 50, 25, 15, 2.5 and 1 µg mL⁻¹. The concentrations 2000; 1000; 500; 250; 125; 62.5 and 31.25 µg mL⁻¹ were utilized only for the liposome and TBARS tests. BHT was used as a standard for all the analyses. Absorbance measurements were performed on a UV/Vis spectrophotometer (Shimadzu UV-160 1 PC).

2.4 Effect of EOs on acetylcholinesterase enzyme activity

The effect of EOs on the activity of acetylcholinesterase was evaluated using the method of Ellman et al.³⁰ The analysis consists of monitoring the rate of formation of 5-thio-2-

nitrobenzoate. This compound is formed by reacting Ellman's Reagent (5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid or its ionic form) with thiocholine.

The procedure consisted of adding 2970 μL of buffer Tris-HCl pH 8 (50 mmol L^{-1}) and 25 μL of acetylcholinesterase solution (1000 U mL^{-1} ; type VI-S) from *Electrophorus electricus*. The mixture was incubated at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ for 5 minutes. Then, 25 μL of the sample (EO diluted in ethanol at concentrations of 100; 50; 10; 5; 1.0; 0.50 and $0.25 \mu\text{g mL}^{-1}$), 100 μL of Ellman's reagent (10 mmol L^{-1}) and 80 μL of acetylcholine iodide solution (0.02 mol L^{-1}) were added. The mixture was incubated at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ for 15 minutes, and the absorbance at 412 nm was measured. Carvacrol was used as a standard for comparison.

2.5 Statistical analysis

The effects of the EOs on fungal growth were expressed as percentage inhibition of the colony growth in each treatment relative to the control $[(\%) = (d_{\text{control}} - d_{\text{treatment}}/d_{\text{control}})*100]$. The treatments were arranged in a 5×3 factorial scheme (Concentration \times OE) and subjected to analysis of variance (one-way ANOVA). The means were compared by the Tukey's post hoc test with a significance level of 5% ($p \leq 0.05$) using the Sisvar software version 5.6.³¹

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Chemical characterization of the essential oils

The results obtained from the chemical characterization of the EOs from coriander (CEO), dill (EEO) and garlic (AEO) are shown in Table 1. The principal constituent identified in the CEO was linalool (93.277%). In the EEO, five constituents were identified, with carvone the highest concentration (83.038%). In the case of AEO, five major constituents were also quantified, with diallyl trisulfide (75.126%) being the principal constituent.

Table 1– Chemical compositions of EOs from *C. sativum*, *A. graveolens* and *A. sativum*

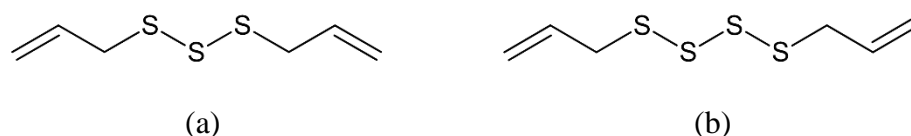
<i>Coriandrum sativum</i>				
Constituents	RT (min)	RI _{tab}	RI _{cal}	N. Area (%)
Linalool	12.246	1095	1100	93.277
Camphor	14.267	1141	1147	2.931
γ- Terpinene	10.600	1054	1057	2.218
α-Tujene	6.457	924	933	1.001
ρ-Cymene	9.335	1020	1023	0.573
Total				100.000
<i>Anethum graveolens</i>				
Constituents	RT (min)	RI _{tab}	RI _{cal}	N. Area (%)
Carvone	18.451	1239	1243	83.038
Limonene	9.526	1024	1028	12.626
Apiole (NI)	33.918	1677	1616	4.337*
Total				100.000
<i>Allium sativum</i>				
Constituents	RT (min)	RI _{tab}	RI _{cal}	N. Area (%)
Diallyl. trisulfide	20.947	-	1300	75.126
Diallyl. tetrasulfide	11.431	-	1078	19.506
Allyl methyl trisulfide	13.872	-	1138	5.299
Diallyl sulphide	4.647	-	856	0.034
Methyl 2-propenyl Disulfide	5.971	-	916	0.019
Total				99.984

RT: Retention time; RI_{tab}: Literature retention index; RI_{cal}: Calculated retention index; N. Area: Normalization of the area; *Confirmed by the Kovats index; -: Quantified but not identified.

Investigations by El-sayed et al³² indicated that diallyl trisulfide was the principal constituent of the AEO obtained from different cultivars, ranging from 45.76 to 58.53%. Later Esmaeili et al³³ found diallyl trisulfide (33.47%) as the principal compound in the AEO, followed by diallyl tetrasulfide (19.77%). The results obtained in this study are in agreement with the aforementioned authors in relation to chemical composition; however, the concentrations

(75.13% diallyl trisulfide and 19.51% diallyl tetrasulfide) differ from those reported in the literature (Figure 1). These organosulfur compounds are formed after the decomposition of thiosulfates, which are highly unstable and rearrange to form a wide variety of sulfur-containing substances that are responsible for the characteristic aroma of garlic and its biological properties.^{3,34}

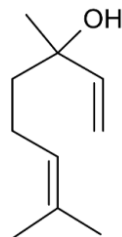
Figure 1 – Chemical structures of diallyl trisulfide (a) and diallyl tetrasulfide (b).



Bazargani and Rohloff³⁵, Lasram et al³⁶ and Micic et al³⁷ characterized more than 30 constituents in CEO. In the present study, only five compounds were identified, namely linalool (93.28%), camphor (2.93%), γ -terpinene (2.22%), α -tujene (1.00%) and ρ -cymene (0.57%). The first three compounds were present in the aforementioned studies, and, although linalool was the principal constituent, there was a difference in concentration (56.79%; 72.34% and 64.04%, respectively). This fact can be explained by the difference in geographic and climatic conditions in the growing region because the coriander seeds were obtained in Iran³⁵, Tunisia³⁶ and Serbia³⁷. The interaction between the plant and the environment affects the synthesis of secondary metabolites because environmental factors influence the metabolic route and, consequently, the production of different phytochemicals.³⁸

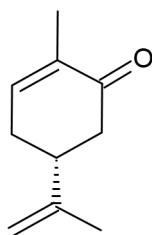
Linalool is a monoterpene (Figure 2) that is synthesized via mevalonate from isopentenyl diphosphate (IPP) and its isomer dimethylallyl diphosphate (DMAPP). This compound is responsible for the biological properties and economic value of the EO. The presence of a hydroxyl group and double bonds makes linalool chemically more reactive and soluble in water than aliphatic monoterpenes, as well as allowing some secondary transformations to occur, including oxidation. The oxidative metabolism can cause changes in the chemical structure of the derived compounds and modify their chemical properties and their economic use.⁹

Figure 2 – Chemical structure of linalool.



Previous studies that characterized the EO of dill seeds produced results different from those found in this study, both in relation to the identity of some constituents and to their concentrations. Researching the EO of dill seeds, Kazemi¹⁴ found that the principal constituents were thymol (20.07%), limonene (16.31%), α -pinene (8.65%) and carvacrol (8.34%). Karimi et al¹⁵, in turn, found apiole (46.10%), carvone (40.51%) and limonene (3.66%). However, Weisany et al³⁹ evaluated the antifungal potential of the EEO and identified fifteen constituents. Carvone was the principal constituent (87.91%), followed by limonene (3.13%). These compounds are similar to those found in this study, but with different concentrations (83.04 and 12.63%, respectively). Carvones (Figure 3) are cyclic unsaturated ketones belonging to the class of oxygenated monoterpenes that have proven biological properties, including the ability to induce apoptosis of skin cancer cells.⁴⁰

Figure 3 – Chemical structure of carvone.



3.2 Antimicrobial activity

3.2.1 Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) by the disk diffusion method

Significant antibacterial activities were observed for the CEO and EEO, whose MIC and MBC values ranged from 6.25 to 12.50 $\mu\text{L mL}^{-1}$, respectively (Table 2). For the AEO, the results ranged from 25.00 to 50.00 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (*E. coli*) and from 12.50 to 25 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (*S. aureus*). Previous research developed by Arasu et al⁴¹ and by Ghazanfari et al⁴² had already demonstrated the antibacterial potential of these EOs, including these same bacteria. It was observed that the MIC and MBC values for AEO were higher for *E. coli* bacteria. This observation can be explained because Gram-negative bacteria are naturally more resistant to the action of EOs because of the presence of an outer membrane in the cell wall, unlike Gram-positive bacteria, which have a single thick layer of peptidoglycan.⁴³ Mallet et al⁴⁴ observed no inhibitory effect by AEO on the bacterium *Pseudomonas aeruginosa*, which is also Gram-negative. EOs are lipophilic substances and, therefore, have the ability to interact with cell membrane lipids to increase the permeability of the bacterial cell. This effect causes a reduction in the Proton Motive Force, in the synthesis of ATP and in the release of intracellular constituents.⁴⁵ Rao, Chen and McClements⁴⁶ mention that the antimicrobial activity of an EO is related to its chemical constituents, mainly those present in highest concentration, and interactions with other components. Terpenoids with polar functional groups are known to have such activity. Bhavaniramya et al⁴⁵ mentioned that carvone is capable of disrupting the structures of the cell's outer membranes. Park et al⁴⁷ inferred that linalool causes damage to the cell wall, inhibits enzymatic activity and interrupts the translation of certain regulatory genes. In the case of sulfur compounds, Rouf et al² mentioned that there is an interaction of thiol groups with pathogen proteins, which causes structural change.

Table 2 – Minimum Inhibitory Concentration ($\mu\text{L mL}^{-1}$) and Minimum Bactericidal Concentration ($\mu\text{L mL}^{-1}$) of the essential oils from *C. sativum*, *A. graveolens* and *A. sativum* against the *E. coli* and *S. aureus* bacteria.

Bacteria	<i>C. sativum</i>			<i>A. graveolens</i>			<i>A. sativum</i>		
	Difusion in disk (mm)	MIC	MBC	Difusion in disk (mm)	MIC	MBC	Difusion in disk (mm)	MIC	MBC
<i>E. coli</i>	NI	6.25	12.50	NI	6.25	12.50	NI	25.00	50.00
<i>S. aureus</i>	8.1 ± 1.78	6.25	12.50	2.0 ± 1.0	6.25	12.50	**	12.50	25.00

NI (No inhibition)

** Inhibition

No formation of an inhibition halo was observed for the *E. coli* bacteria in the presence of the three EOs tested (Table 2). On the contrary, the AEO completely inhibited the growth of *S. aureus*; for the CEO and EEO, the diameters of the inhibition halos were 8.1 ± 1.78 mm and 2.0 ± 1.0 mm, respectively. For Rao, Chen and McClements⁴⁶, the antimicrobial activity is classified according to the zone of inhibition, which can be defined as strong (≥ 20 mm), moderate (> 12 mm < 20 mm) and weak (< 12 mm). Thus, weak inhibitory activity was observed for the CEO and EEO. It is important to emphasize that no inhibition was observed for the EOs diluted in Tween 80.

3.2.2 Inhibitory effect of EOs on mycelial growth of mycotoxigenic fungi

Mycelial growth of mycotoxigenic *Aspergillus* fungi was inhibited by CEO and EEO in a dose-dependent manner (Table 3). The growth of the fungi *A. carbonarius* and *A. ochraceus* was completely inhibited by the AEO at all the tested concentrations. This EO was considered to be the most effective in the control of the two fungi. It was found that *A. ochraceus* was the fungus most resistant to CEO and EEO (Figure 4). There was no inhibition of fungal growth by the CEO at $1000 \mu\text{L mL}^{-1}$, and a statistical difference was observed at higher concentrations. Nevertheless, the inhibition of growth of *A. carbonarius* was greater than that of *A. ochraceus*. Greater inhibition by EEO than by CEO was observed for both fungi. The inhibition of growth of *A. carbonarius* was observed up to a concentration of $500 \mu\text{L mL}^{-1}$, whereas a 75.79% decrease in growth rate at the same concentration was observed for *A. ochraceus* (Table 3). When they studied the activity of coriander essential oil, Das et al¹¹ reported that the EO completely inhibited the growth of some fungal species, including the *Aspergillus* genus, at concentrations lower than those found in this study, but no tests were performed with *A. carbonarius* and *A. ochraceus*.

Table 3 – Percent inhibition of the mycelial growth of *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus ochraceus* by the EOs from *C. sativum*, *A. graveolens* and *A. sativum*

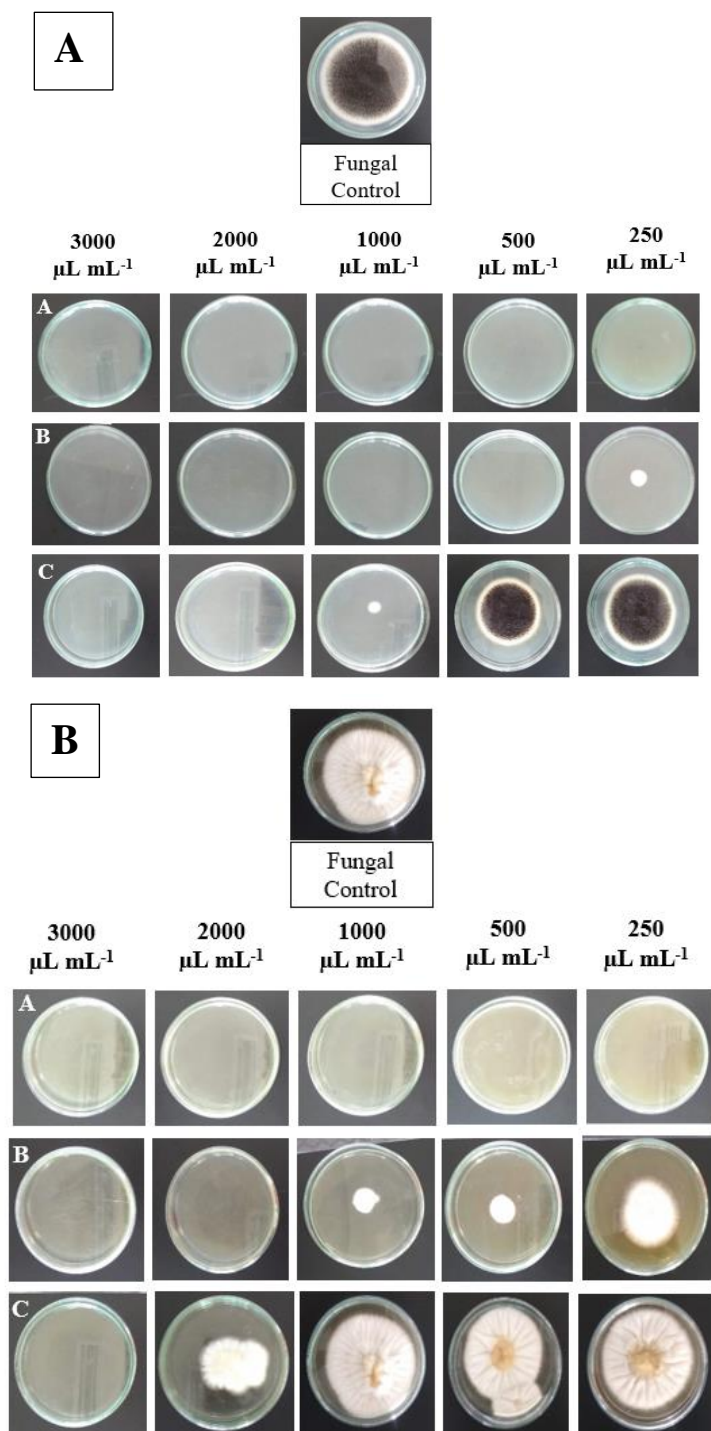
	Concentration ($\mu\text{L mL}^{-1}$)	Percent of inhibition of mycelial growth		
		<i>C. sativum</i>	<i>A. graveolens</i>	<i>A. sativum</i>
<i>Aspergillus carbonarius</i>	3000	100.00 Aa	100.00 Aa	100.00 Aa
	2000	100.00 Aa	100.00 Aa	100.00 Aa
	1000	76.90 Bb	100.00 Aa	100.00 Aa
	500	25.30 Bc	100.00 Aa	100.00 Aa
	250	9.63 Cd	79.51 Bb	100.00 Aa
<i>Aspergillus ochraceus</i>	3000	100.00 Aa	100.00 Aa	100.00 Aa
	2000	28.92 Bb	100.00 Aa	100.00 Aa
	1000	NI Cc	73.49 Bb	100.00 Aa
	500	NI Cc	75.79 Bb	100.00 Aa
	250	NI Cc	38.98 Cb	100.00 Aa

Means followed by the same lower case (column) and uppercase (row) letter do not differ by the Tukey test (5% probability). NI: No inhibition

The resistance of *A. ochraceus* was greater than that of *A. carbonarius*, due to the difference in the chemical constituents of the EOs. Lasram et al³² showed the carvone had greater antifungal activity than linalool, this explain why OEE was more effective in controlling fungal growth than OEC.

As mentioned above, the antimicrobial activity of EOs can be attributed to their fat-soluble character, and it is suggested that the antifungal effect of EOs is based on membrane rupture by inhibiting ergosterol biosynthesis, which causes the leakage of cytoplasmic content and generates an internal cellular imbalance with a change in the functioning of the organelles. This statement was proven in the study by Das et al¹¹, who evaluated the antifungal effect of CEO, as well as by Kujur, Kumar and Prakash⁴⁸, who elucidated the mechanism of action of the EO from *Eugenia caryphyllata*. In the study by Brandão et al⁴⁹, the authors confirmed the antifungal and antimycotoxigenic effect of the essential oil from *Eremanthus erythropappus* against three different *Aspergillus* species, including *A. carbonarius* and *A. ochraceus*. They demonstrated that the inclusion of the EO inhibited ergosterol biosynthesis and damage the integrity of the fungal cell membrane.

Figure 4 – Inhibition of the mycelial growth of *Aspergillus carbonarius* (A) and *Aspergillus ochraceus* (B) by the EOs from *C. sativum*, *A. graveolens* and *A. sativum*



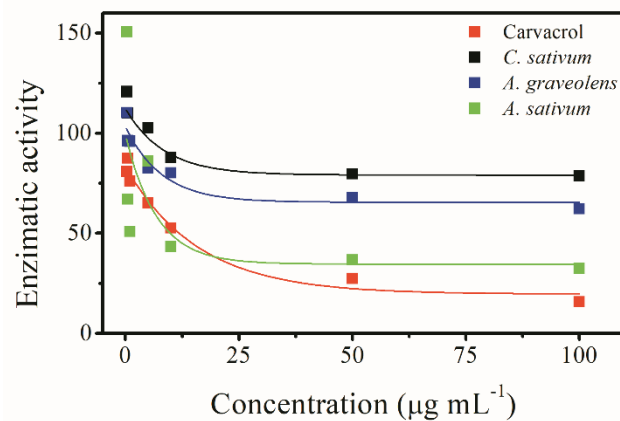
Legend: A: AEO; B: EEO; C: CEO

3.3 Effect of EOs on acetylcholinesterase enzyme activity

The results obtained regarding the effect of the concentration of EOs on the enzymatic activity are shown in Figure 5. No significant decrease in AChE activity was observed with the application of the CEO and EEO, even at the highest concentrations ($IC_{50} > 100 \mu\text{g mL}^{-1}$). There are significant differences in the chemical structures of the constituents of EOs that could influence the interactions and enzyme inhibition. Barbosa et al⁵⁰ reported that EOs composed mainly of sesquiterpenes have a greater inhibitory effect than those composed of monoterpenes. This fact can be explained by the synergistic interactions that occur in these compounds. However, Lopez and Pascual-Villalobos⁵¹ inferred that some monoterpenes are considered to be strong inhibitors, such as 1,8-cineole. High concentrations of linalool and carvone are necessary for strong inhibition of AChE to occur, and greater inhibition by carvone is observed than by linalool because of its conjugated double bond.

Using a molecular approach, Barbosa et al⁵⁰ inferred that the main constituents of EOs interact with AChE through Van der Waals bonds and hydrophobic interactions. Such binding was considered exergonic, reversible and competitive and because of these characteristics; the action of other substances is possible. The inhibitory activity itself occurs through the bonds between the compounds of the EOs with the enzyme's amino acids. In the case of those EOs that contain organosulfur compounds, such as AEO, the interaction can occur between sulfur and oxygen atoms, forming π -sulfur interactions and hydrogen bonds, respectively.⁵²

Figure 5 – Effect of EO concentration on acetylcholinesterase enzyme activity.



AEO was efficient in decreasing AChE activity. The IC_{50} ($9.67 \mu\text{g mL}^{-1}$) did not differ statistically from that of the carvacrol standard ($IC_{50} 12.53 \mu\text{g mL}^{-1}$). Baluchnejadmojarad et al⁵³ evaluated the anticholinesterase activity of S-allyl cysteine, which is an organosulfur compound found in garlic extracts, and observed that there was a decrease in AChE activity, which could have improved cognitive impairment. Rocchetti et al⁵⁴ also reported that extracts obtained from different species of the genus *Allium* have the ability to inhibit AChE activity. In cases of poisoning caused by agrochemicals or toxic metals, activation of the AChE enzyme is necessary. Previous studies by Pari and Murugavel⁵⁵ obtained promising results in the activation of AChE by diallyl tetrasulfide. The authors suggested that this compound was able to reduce the oxidative stress induced by cadmium. There must be a balance between enzyme and neurotransmitter because AChE is a key enzyme in behavioral processes.

3.4 *In vitro* antioxidant activity of EOs (AOX)

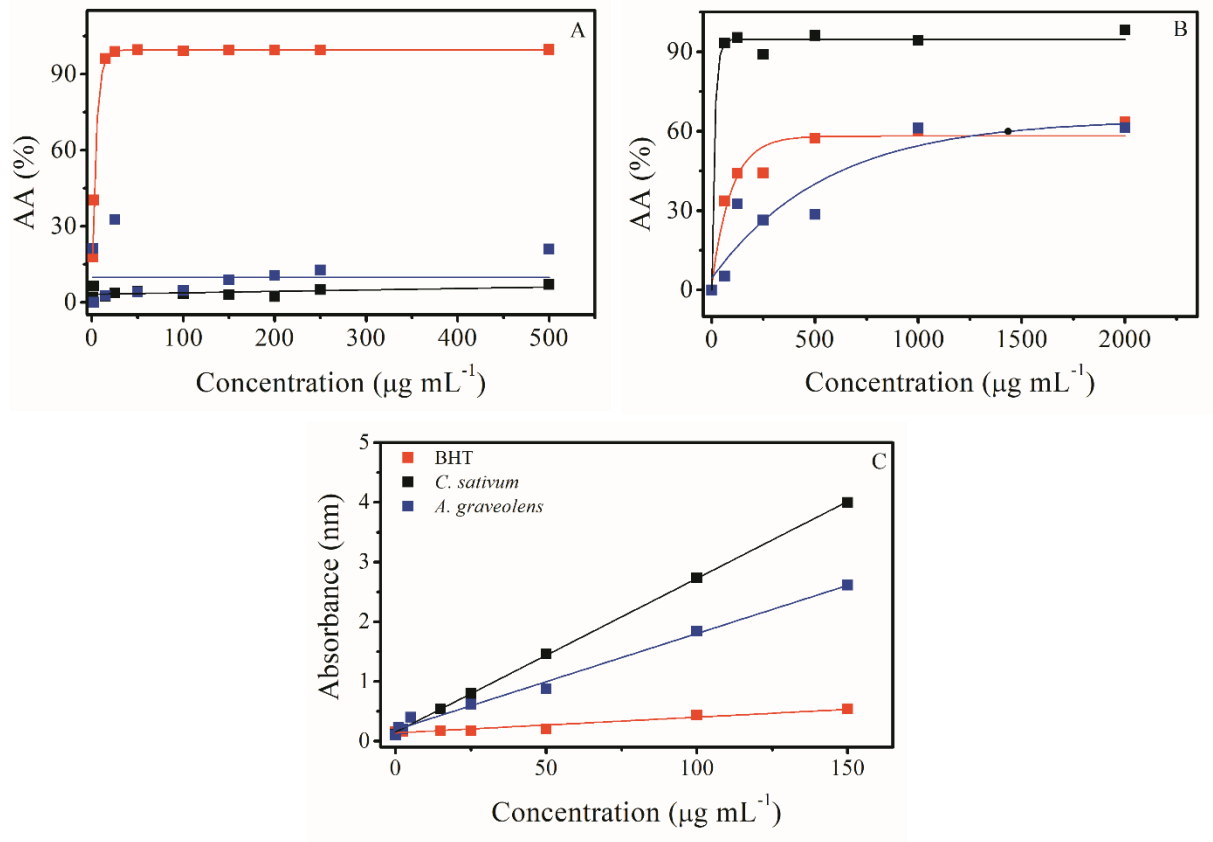
There are many techniques for determining the AOX of a substance. Among the colorimetric assays, those involving the capture of free radicals (ABTS, DPPH), the complexing of metals (phosphomolybdenum) and the inhibition of lipid oxidation [reactive species of thiobarbituric acid (TBARS), β -carotene/linoleic acid system and liposomes) are the most common. Depending on the method employed, a substance might or might not have activity, depending on the complexity of the oxidation processes. An isolated method is not able to provide a complete antioxidant profile of a plant species and its constituents.⁵⁶ Specifically, in the case of EOs, the insolubility in water and the chemical structures of their constituents are factors that directly influence the choice of method.

No AOX was observed in the colorimetric assays with AEO. Garlic is considered to be a potent antioxidant, but its action is indirect. The constituents of garlic are responsible for activating factor 2, which is related to the activation of antioxidant and detoxifying enzymes, such as glutathione, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and heme 1-oxygenase. Therefore, the levels of mitochondrial damage caused by reactive oxygen species decrease.⁵⁷ In the case of allicin, which is a reactive sulfur-containing substance, the redox reaction occurs through disulfide bonds between the thiol groups and glutathione or proteins that contain cysteine.⁵⁸ Thus, no results were observed for the AEO in conventional assays because

such compounds act on living systems by activating antioxidant enzymes. In the study by Mallet et al.⁵⁹ the authors also found that the AEO did not affect the presence of AOX by the DPPH radical capture method.

The principal compounds in EOs that have high AOX values usually possess phenolic characteristics, such as clove EO, which contains mainly eugenol. These substances are able to stabilize free radicals through the transfer of hydrogen atoms or electrons. In the absence of these constituents, a low or non-existent activity is verified, as was reported by Ferreira et al.¹⁹ The results of the ABTS assay shown in Figure 6A corroborate these statements, because the BHT standard presented a dose-dependent relationship; that is, the antioxidant activity was proportional to the sample concentration (IC_{50} 3.30 $\mu\text{g mL}^{-1}$). On the other hand, no activity was observed for EEO and CEO, whose IC_{50} were >500 and 7387 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. This behavior was also verified in the DPPH assay, and it is in agreement with the study by Silva et al.⁶⁰ The chemical structure of carvone (principal constituent) does not allow it to react by such a mechanism. In addition to the radical-scavenging methods, no AOX was observed for EEO in the other assays, except for phosphomolybdenum.

Figure 6 – Antioxidant capacity of EOs in three colorimetric assays. A: ABTS ($\mu\text{g mL}^{-1}$); B: TBARS ($\mu\text{g mL}^{-1}$); C: Phosphomolybdenum (Abs nm).



An IC_{50} of $8.02 \mu\text{g mL}^{-1}$ for the inhibition of the formation of species reactive to thiobarbituric acid was observed with CEO (Figure 6B). This value was lower than that found for BHT, for which an IC_{50} of $229.31 \mu\text{g mL}^{-1}$ was observed. Lipid oxidation is a chain reaction in which free radicals interact with unsaturated fatty acids to form a multitude of compounds, including malonaldehyde, which is responsible for imparting strange flavors and odors to foods, in addition to being a marker of oxidative damage in physiological systems. Malonaldehyde reacts with thiobarbituric acid to form a pink colored complex, so it is possible to determine whether an antioxidant substance is able to protect lipids against oxidation in the TBARS test.⁶¹ In the case of CEO, whose principal compound identified was linalool, this activity can be attributed to the chemical structure of the monoterpene, which has double bonds and reduced functional groups that are susceptible to oxidation,⁶² unlike carvone, the principal constituent identified in the EEO. In the study of Devasagayam; Moldy; Ramasarma⁶³, the authors inferred

that functional groups such as ketones can interfere in the assay because they can react with thiobarbituric acid.

Another test used to assess the ability of EOs to inhibit lipid peroxidation was that of β -carotene/linoleic acid. It is a test with conditions similar to those found in the food industry because it is performed in an emulsion. The capacity of the EO to protect the β -carotene system was evaluated.¹⁰ However, the results were not as significant as in the TBARS method, where an IC_{50} of $446.23 \mu\text{g mL}^{-1}$ was observed for the CEO. Regarding BHT, the IC_{50} values were $0.69 \mu\text{g mL}^{-1}$. In the liposome assay, no activity was observed for either EO, with $IC_{50} > 2000 \mu\text{g mL}^{-1}$. An IC_{50} of $258.30 \mu\text{g mL}^{-1}$, was observed for the BHT standard. Liposomes are strongly affected by the incorporation of EOs, as was observed in the study by Allaw et al⁶⁴, and this incorporation can influence the test result.

Metal complexation is also one of the mechanisms by which oxidation can be controlled because the metal ions catalyze this reaction and also participate in the formation of reactive oxygen species. The phosphomolybdenum assay is often used to determine the total antioxidant activity by evaluating the chelating capacity of a substance.⁶⁵ In this study, it was observed that the CEO and EEO were efficient in reducing the phosphomolybdenum complex. The absorbance values were higher than those of the BHT standard. The greater the slope of the straight line, the greater the reducing effect of the molecule (Figure 6.C). Anthocyanins and some constituents of EOs are considered to be potent antioxidants. They are able to donate electrons or hydrogen atoms to free radicals or transition metals because they are stabilized by resonance structures that provide a certain stability to the radical formed.⁶⁶ In the study by Pavlic et al⁶⁵, the authors inferred that the EO from peppermint exhibited antioxidant activity as a result of the high concentration of terpenoids, including compounds with alcohol functional groups.

Thus, the EO constituents are responsible for conferring AOX; this effect was isolated, synergistic or antagonistic. The methods used have different mechanisms of action, so the activity of an EO might be observed in a certain method and not seen in other tests, as was the case in this study.

4. CONCLUSION

The greatest activity in controlling the growth of the fungi *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* and in inhibiting the activity of the acetylcholinesterase enzyme was observed for the essential oil from *Allium sativum*. This oil is being considered as an agent in the formulations of sanitizers, drugs and agrochemicals. Antimicrobial effects were also observed for the essential oils from *Coriandrum sativum* and *Anethum graveolens*. A satisfactory result in the antioxidant test of reactive species with thiobarbituric acid was only obtained with *C. sativum*. Thus, in vivo studies must be performed to demonstrate such biological properties in food systems, as well as using new technologies such as nanotechnology to preserve and release essential oils in a controlled manner.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ); and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Finance code 001.

The authors thank the scholarships and financial support and the Central of Analysis and Chemical Prospecting of the Federal University of Lavras for supplying the equipment for chromatographic analyzes.

REFERENCES

1. ASBAHANI, A. E. et al. Essential oils: From extraction to encapsulation. *International journal of pharmaceutics*, v. 483, n. 1-2, p. 220-243, 2015.
2. ROUF, R. et al. Anti-viral potential of garlic (*Allium sativum*) and its organosulfur compounds: a systematic update of pre-clinical and clinical data. *Trends in food science & technology*, v. 104, p. 219-234, 2020.
3. LLANA-RUIZ-CABELLO, M. L. R et al. Cytotoxic and mutagenic in vitro assessment of two organosulfur compounds derived from onion to be used in the food industry. *Food chemistry*, v. 166, p. 423-431, 2015.
4. TSAI, C. Y. et al. Antioxidant effects of diallyl trisulfide on high glucose-induced apoptosis are mediated by the PI3K/Akt-dependent activation of Nrf2 in cardiomyocytes. *International journal of cardiology*, v. 168, n. 2, p. 1286-1297, 2013.
5. NICASTRO, H. L.; ROSS, S. A.; MILNER, J. A. Garlic and onions: their cancer prevention properties. *Cancer prevention research*, v. 8, n. 3, p. 181-189, 2015.
6. POURZAND, A. et al. Associations between Dietary Allium Vegetables and Risk of Breast Cancer: A Hospital-Based Matched Case-Control Study. *J Breast Cancer*, v. 19, n. 3 p. 292-300, 2016.
7. TEIXEIRA, B. et al. Characterization of fish protein films incorporated with essential oils of clove, garlic and origanum: Physical, antioxidant and antibacterial properties. *LWT-Food Science and Technology*, v. 59, n. 1, p. 533-539, 2014.
8. GARCIA-DIEZ, J. et al. Behaviour of food-borne pathogens on dry cured sausage manufactured with herbs and spices essential oils and their sensorial acceptability. *Food Control*, v. 59, p. 262- 70, 2016.
9. ILC, T. et al. Monoterpenol oxidative metabolism: role in plant adaptation and potential applications. *Frontiers in plant science*, v. 7, p. 509, 2016.
10. DUARTE, A. et al. Antioxidant properties of coriander essential oil and linalool and their potential to control *Campylobacter* spp. *Food Control*, v. 61, p. 115-122, 2016.
11. DAS, S. et al. Encapsulation in chitosan-based nanomatrix as an efficient green technology to boost the antimicrobial, antioxidant and in situ efficacy of *Coriandrum sativum* essential oil. *International journal of biological macromolecules*, v. 133, p. 294-305, 2019.
12. CHEN, Y. et al. Dill (*Anethum graveolens* L.) seed essential oil induces *Candida albicans* apoptosis in a metacaspase-dependent manner. *Fungal biology*, v. 118, n. 4, p. 394-401, 2014.

13. TENEVA, D. et al. Biological preservation of mayonnaise with *Lactobacillus plantarum* LBRZ12, dill, and basil essential oils. *Food Chemistry*, v. 344, 2021.
14. KAZEMI, M. Chemical composition and antimicrobial, antioxidant activities and anti-inflammatory potential of *Achillea millefolium* L., *Anethum graveolens* L., and *Carum copticum* L. essential oils. *Journal of Herbal Medicine*, v. 5, n. 4, p. 217-222, 2015.
15. KARIMI, K. et al. Funneliformis mosseae root colonization affects *Anethum graveolens* essential oil composition and its efficacy against *Colletotrichum nymphaeae*. *Industrial Crops and Products*, v. 90, p. 126-134, 2016.
16. NGUYEN, D. K; JANG, C.H. An acetylcholinesterase-based biosensor for the detection of pesticides using liquid crystals confined in microcapillaries. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 200, 2021.
17. RIBEIRO, R. C. et al. Feeding and oviposition of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) with sublethal concentrations of ten condiments essential oils. *Industrial Crops and Products*, v. 74, p. 139-143, 2015.
18. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). In: Farmacopeia Brasileira, Brasília, 5th ed. v. 1, p. 198-199, 2010.
19. FERREIRA, V. R. F. et al. Colorimetric, electroanalytical and theoretical evaluation of the antioxidant activity of *Syzygium aromaticum* L., *Origanum vulgare* L., *Mentha spicata* L. and *Eremanthus erythropappus* M. essential oils, and their major constituents. *New Journal of Chemistry*, v. 43, n. 20, p. 7653-7662, 2019.
20. ADAMS, R. P. Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/ Mass Spectroscopy, Carol Stream: Allured, p. 469, 2007.
21. CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, Approved standard – Tenth Edition. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) document M07 – A10, Volume 35, Number 2, 2015.
22. CLSI. Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada – Oitava Edição. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) document, Volume 23, Número 1, 2003.
23. CAETANO, A. R. S. et al. Chemical characterization and determination of *in vivo* and *in vitro* antifungal activity of essential oils from four *Eucalyptus* species against the *Hemileia vastatrix* Berk and Br fungus, the agent of coffee leaf rust. *Australian Journal of Crop Science*, v. 14, n. 9, 2020.
24. GUERREIRO, A. C. et al. The effect of temperature and film covers on the storage ability of *Arbutus unedo* L. fresh fruit. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v. 159, p. 96-102, July 2013.

25. TEIXEIRA, M. et al. Citrumelo Swingle: Caracterização Química, Atividade Antioxidante e Antifúngica dos Óleos Essenciais das Cascas Frescas e Secas. *Magistra*, v. 24, n. 3, p. 194-203, 2012.
26. DANDLEN, S. A. et al. Antioxidant activity of six Portuguese thyme species essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, Chichester, v. 25, p. 150-155. 2010.
27. PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, New York, v. 269, n. 2, p. 337-341, May 1999.
28. KULISIC, T. et al. Use of different methods for testing antioxidative activity of orégano essential oil. *Food Chemistry*, v. 85, p. 633-640, 2004.
29. BOULANOVAR, B. et al. Antioxidant activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils. *Industrial Crops and Products*, Philadelphia, v. 46, p. 85-96, Apr, 2013.
30. ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, [S.1.], v.7, p.88 – 95, 1961.
31. FERREIRA D.F., 2015. Programas. Disponível em: <<https://des.ufla.br/~danielff/programas/programas.html>>. Acesso em 30 de outubro de 2020.
32. EL-SAYED, H. S. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of garlic essential oils evaluated in organic solvent, emulsifying, and self-microemulsifying water based delivery systems. *Food Chemistry*, v. 221, p. 196-204, 2017.
33. ESMAEILI, H. et al. Incorporation of nanoencapsulated garlic essential oil into edible films: A novel approach for extending shelf life of vacuum-packed sausages. *Meat science*, v. 166, 2020.
34. POOJARY, M. M. et al. Stability and extraction of bioactive sulfur compounds from *Allium* genus processed by traditional and innovative technologies. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 61, p. 28-39, 2017.
35. BAZARGANI, M. M; ROHLOFF, J. Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms. *Food control*, v. 61, p. 156-164, 2016.
36. LASRAM, S. et al. Antifungal and antiaflatoxinogenic activities of *Carum carvi* L., *Coriandrum sativum* L. seed essential oils and their major terpene component against *Aspergillus flavus*. *Industrial crops and products*, v. 134, p. 11-18, 2019.
37. MICIC, D. et al. Essential oils of coriander and sage: Investigation of chemical profile, thermal properties and QSRR analysis. *Industrial Crops and Products*, v. 138, 2019.

38. GOBBO-NETO, L; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química nova*, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.
39. WEISANY, W. et al. Nano silver-encapsulation of *Thymus daenensis* and *Anethum graveolens* essential oils enhances antifungal potential against strawberry anthracnose. *Industrial Crops and Products*, v. 141, 2019.
40. GOPALAKRISHNAN, T et al. Preventive effect of D-carvone during DMBA induced mouse skin tumorigenesis by modulating xenobiotic metabolism and induction of apoptotic events. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 111, p. 178-187, 2019.
41. ARASU, M. V. et al. Essential oil of four medicinal plants and protective properties in plum fruits against the spoilage bacteria and fungi. *Industrial Crops and Products*, v. 133, p. 54-62, 2019.
42. GHAZANFARI, N. et al. Microwave-assisted hydrodistillation extraction of essential oil from coriander seeds and evaluation of their composition, antioxidant and antimicrobial activity. *Heliyon*, v. 6, n. 9, 2020.
43. NAZZARO, F. et al. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, v. 6, n. 12, p. 1451-1474, 2013.
44. MALLETT, A. C. T. et al. Chemical characterization of the *Allium sativum* and *Origanum vulgare* essential oils and their inhibition effect on the growth of some food pathogens. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 16, p. 804-811, 2014.
45. BHAVANIRAMYA, S. et al. Role of essential oils in food safety: Antimicrobial and antioxidant applications. *Grain & Oil Science and Technology*, v. 2, p. 49-55, 2019.
46. RAO, J.; CHEN, B.; MCCLEMENTS, D. J. Improving the efficacy of essential oils as antimicrobials in foods: Mechanisms of action. *Annual review of food science and technology*, v. 10, p. 365-387, 2019.
47. PARK, S. N. et al. Antimicrobial effect of linalool and α -terpineol against periodontopathic and cariogenic bacteria. *Anaerobe*, v. 18, n. 3, p. 369-372, 2012.
48. KUJUR, A; KUMAR, A; PRAKASH, B. Elucidation of antifungal and aflatoxin B1 inhibitory mode of action of *Eugenia caryophyllata* L. essential oil loaded chitosan nanomatrix against *Aspergillus flavus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 172, 2021.
49. BRANDÃO, R. M. et al. Antifungal and antimycotoxigenic effect of the essential oil of *Eremanthus erythropappus* on three different *Aspergillus* species. *Flavour and Fragrance Journal*, v. 35, n. 5, p. 524-533, 2020.
50. BARBOSA, D. C. S. et al. Chemical composition and acetylcholinesterase inhibitory potential, in silico, of *Myrciaria floribunda* (H. West ex Willd.) O. Berg fruit peel essential oil. *Industrial Crops and Products*, v. 151, 2020.

51. LOPEZ, M. D.; PASCUAL-VILLALOBOS, M. J. Mode of inhibition of acetylcholinesterase by monoterpenoids and implications for pest control. *Industrial Crops and Products*, v. 31, n. 2, p. 284-288, 2010.
52. ZILBEYAZ, K; OZTEKIN, A; KUTLUANA, E. G. Design and synthesis of garlic-related unsymmetrical thiosulfonates as potential Alzheimer's disease therapeutics: In vitro and in silico study. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 40, 2021.
53. BALUCHNEJADMOJARAD, T. et al. S-allyl cysteine ameliorates cognitive deficits in streptozotocin-diabetic rats via suppression of oxidative stress, inflammation, and acetylcholinesterase. *European journal of pharmacology*, v. 794, p. 69-76, 2017.
54. ROCCHETTI, G. et al. The functional potential of nine *Allium* species related to their untargeted phytochemical characterization, antioxidant capacity and enzyme inhibitory ability. *Food Chemistry*, v. 368, 2022.
55. PARI, L.; MURUGAVEL, P. Diallyl tetrasulfide improves cadmium induced alterations of acetylcholinesterase, ATPases and oxidative stress in brain of rats. *Toxicology*, v. 234, n. 1-2, p. 44-50, 2007.
56. NILE, S. H. et al. Utilization of quercetin and quercetin glycosides from onion (*Allium cepa* L.) solid waste as an antioxidant, urease and xanthine oxidase inhibitors. *Food chemistry*, v. 235, p.119-126, 2017.
57. RIBEIRO, M. et al. From the distinctive smell to therapeutic effects: Garlic for patients with chronic kidney disease. *Clinical Nutrition*, 2021.
58. BORLINGHAUS, J. et al. Allicin: chemistry and biological properties. *Molecules*, v. 19, n. 8, p. 12591-12618, 2014.
59. MALLET, A. C. T. et al. Composição química de óleos essenciais condimentares e suas atividades antioxidante e antibacteriana. *Hig. alim.*, p. 108-112, 2013.
60. SILVA, J. M. A. et al. Chemical composition and in vitro antimicrobial, antifungal and antioxidant properties of essential oils obtained from some herbs widely used in Portugal. *Food Control*, v. 32, n. 2, p. 371-378, 2013.
61. GHANI, M. A. et al. Measurement of antioxidant activity with the thiobarbituric acid reactive substances assay. *Food chemistry*, v. 230, p. 195-207, 2017.
62. NOACCO, N. et al. Simple colorimetric method to determine the in vitro antioxidant activity of different monoterpenes. *Analytical biochemistry*, v. 555, p. 59-66, 2018.
63. DEVASAGAYAM, T. P. A.; BOLOOR, K. K.; RAMASARMA, T. Methods for estimating lipid peroxidation: an analysis of merits and demerits. 2003.

64. ALLAW, M. et al. Formulation of liposomes loading lentisk oil to ameliorate topical delivery, attenuate oxidative stress damage and improve cell migration in scratch assay. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 144, p. 112351, 2021.
65. PAVLIC, B. et al. Antioxidant and enzyme-inhibitory activity of peppermint extracts and essential oils obtained by conventional and emerging extraction techniques. *Food Chemistry*, v. 338, 2021.
66. QIAN, B. J. et al. Effect of complexes of cyanidin-3-diglucoside-5-glucoside with rutin and metal ions on their antioxidant activities. *Food chemistry*, v. 232, p. 545-551, 2017.