



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA/FITOTECNIA**

**MICHEL DOUGLAS SANTOS RIBEIRO**

**COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA E POTENCIAL ANTIMICROBIANO DOS**  
**ÓLEOS ESSENCIAIS DE ALECRIM-PIMENTA E CITRONELA**

**FORTALEZA**

**2021**

MICHEL DOUGLAS SANTOS RIBEIRO

COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA E POTENCIAL ANTIMICROBIANO DOS ÓLEOS  
ESSENCIAS DE ALECRIM-PIMENTA E CITRONELA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia/Fitotecnia. Área de concentração: Horticultura.

Orientador: Prof. Dr. Renato Innecco

FORTALEZA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- R37 Ribeiro, Michel Douglas Santos.  
Composição fitoquímica e potencial antimicrobiano dos óleos essenciais de Alecrim-pimenta e Citronela /  
Michel Douglas Santos Ribeiro. – 2021.  
43 f. : il.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de  
Pós-Graduação em Agronomia (Fitotecnia), Fortaleza, 2021.  
Orientação: Prof. Dr. Renato Innecco.
1. aditivos naturais. 2. compostos fenólicos. 3. Staphylococcus aureus.. I. Título.

CDD 630

---

MICHEL DOUGLAS SANTOS RIBEIRO

COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA E POTENCIAL ANTIMICROBIANO DOS ÓLEOS  
ESSENCIAS DE ALECRIM-PIMENTA E CITRONELA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia/Fitotecnia. Área de concentração: Horticultura.

Aprovada em: 19/07/2021

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Renato Innecco (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Alfredina Araújo dos Santos  
Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)

---

MSc. João Alves Ferreira Pereira  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A minha avó Maria Antônia dos Santos (*in  
memorium*) um exemplo de mãe, mulher, esposa  
e avó. Saudades eternas.

***DEDICO!***

## **AGRADECIMENTOS**

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador e professor Renato Innecco por todo apoio, compreensão, paciência e oportunidade. Aos membros da banca Profa. Dra. Alfredina dos Santos e ao MSc. João Alves pela amizade, disponibilidade e colaboração para melhoria do trabalho.

A minha mãe Maria de Lourdes que sempre fez o possível e o impossível para que pudesse ter uma formação, mesmo com pouca instrução e conhecimento sobre a minha formação sempre tive apoio e encorajamento.

Aos professores e técnicos do PPGAF/UFC, em especial, ao secretário Vitor e o coordenador José Wagner por sempre estarem a nossa disposição.

Ao CVT/UFCG pela parceria e disponibilidade em dispor de todas as ferramentas para que pudesse realizar a pesquisa, em especial, a professora Alfredina por não medir esforços em me ajudar. Gratidão.

Aos meus familiares que mesmo sem entender o que é a pós-graduação me apoiaram e me apoiam. Amo todos vocês! Principalmente minha mãe Maria de Lourdes e o meu pai José Valderice por acreditarem em mim.

A Mikaele Fernandes por ser minhas mãos e pés no laboratório. Serei eternamente grato por toda paciência, apoio e ensinamentos. Meu muito obrigado!

Aos meus amigos-irmão que a PPGAF me deu Lucas Carvalho, Allyson Lima e João Alves (AGRO É POC). Aos amigos que conheci na PPGAF, em especial, Thalyta Ravenna, Karolina Rafrana, Josilene Pinheiro, Kelly Andreza, Filipe Eugênio, Dalila Martins, Lailla Queiroz, Caris Viana, Wendson (*in memorium*), Charles Lobo, Cristiane Coutinho e todos aqueles que estiveram presente nessa jornada.

Ao meu amigo Willian Bonner dos Santos por abrir sua moradia para que pudesse ficar hospedado até receber a primeira bolsa. Gratidão!

Aos meus familiares que mesmo sem entender o que é a pós-graduação me apoiaram e me apoiam. Amo todos vocês! A minha equipe VISA por todo apoio e compreensão. Aos meus amigos que levo até hoje na minha trajetória Deborah Rocha, José Jaciel (por sempre me dar o apoio necessário), Leila Felix, Leônidas Canuto, Cledinildo Brilhante, Carlos Alberto, Allan Keis e todos aqueles estiveram comigo direta e indiretamente.

Por todos aqueles que de alguma maneira trouxeram algum aprendizado durante essa temporada tão delicada e difícil.

**Muito obrigado!**

Não lute contra você mesmo,  
você vai ser o único a perder.

**Lucas Silveira**

## RESUMO

Os óleos essenciais (OE's) são compostos por metabólicos secundários e possuem uma mistura complexa de substâncias voláteis, extraídos de diversas partes das plantas, normalmente medicinais. Possuem ampla diversidade e propriedades, entre elas antibacteriana, antifúngica e antiviral. Com a intensificação das pesquisas de potenciais óleos essenciais como candidatos a aditivos naturais o presente trabalho teve o objetivo da pesquisa investigar a composição fitoquímica dos óleos essenciais de Alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) e Citronela (*Cymbopogon nardus*) visando sua aplicação e potencial antimicrobiano frente a bactérias patogênicas de origem alimentar. O experimento foi conduzido no Laboratório de Agricultura Urbana (LAU/UFC) e no Centro Vocacional Tecnológico (CVT/UFCG). Após extração dos óleos essenciais pelo método de arraste à vapor, realizou-se as análises de cromatografia gasosa e caracterização fitoquímica. Em seguida, no laboratório de Microbiologia do (CVT/UFCG) realizou-se os ensaios utilizando o método de difusão e poços para identificar o potencial da atividade antimicrobiana e os testes de susceptibilidade nos métodos. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial (3x3x3) com quatro repetições e o para avaliação do sinergismos entre os óleos (7x3) com quatro repetições. Utilizando o teste PERNAMOVA de duas vias com 9.999 permutações, testados par-a-par pelo teste post-hoc de Mann-Whitney nos softwares R 4.0.2 e Past 4.06. Os resultados permitem concluir que os óleos essenciais estudados de Alecrim-pimenta e Citronela podem ser amplamente utilizado pela indústria devido às suas propriedades repelentes, antioxidantes e antimicrobiana. Principalmente quando usada de forma isolada ou combinada foram eficientes na inibição de *S. aureus*.

**Palavras-chave:** aditivos naturais; compostos fenólicos; *Staphylococcus aureus*.



## ABSTRACT

Essential oils (EO's) are composed of secondary metabolites and have a complex mixture of volatile substances, extracted from various parts of plants, usually medicinal. They have wide diversity and properties, including antibacterial, antifungal and antiviral. With the intensification of research on oil essences as candidates for natural additives, the present work aimed to investigate the phytochemical composition of essential oils of Rosemary-pipper (*Lippia sidoides* Cham.) and Citronella (*Cymbopogon nardus*) seeking their Application and antimicrobial potential against pathogenic bacteria of food origin. The experiment was carried out at the Urban Agriculture Laboratory (LAU/UFC) and at the Technological Vocational Center (CVT/UFCG). After extracting the essential oils using the steam dragging method, gas chromatography analysis and phytochemical characterization were carried out. Then, in the Microbiology laboratory of the (CVT/UFCG) the tests were carried out using the diffusion method and wells to identify the potential of the antimicrobial activity and the susceptibility tests in the methods. The experimental design adopted was completely randomized in a factorial scheme (3x3x3) with four replications and for the evaluation of synergism between oils (7x3) with four replications. Using the two-way PERNAMOVA test with 9,999 permutations, pairwise tested by the Mann-Whitney post-hoc test in R 4.0.2 and Past 4.06 software. The results allow us to conclude that the studied essential oils of Rosemary-pepper and Citronella can be widely used by the industry due to their repellent, antioxidant and antimicrobial properties. Especially when used pediatrically or in combination, they were efficient in strangling *S. aureus*.

**Keywords:** natural additives; phenolic compounds; *Staphylococcus aureus*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	-	Efeito das doses do óleo de ALP puro sobre o diâmetro do halo de inibição no experimento com discos (A) e em poços (B).....	33
Figura 2	-	Efeito das doses do óleo de CTN puro sobre o diâmetro do halo de inibição no experimento com discos (A) e em poços (B).....	34
Figura 3	-	Efeito das doses do óleo de ATN, CTN e combinações sobre o diâmetro do halo de inibição no experimento com discos (A) e em poços (B).....	36

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	-	Informações sobre a cepa de <i>S. aureus</i> utilizada na pesquisa de acordo com INCQS/CMRVS/FIOCRUZ.....	27
Tabela 2	-	Critérios de interpretação para determinação de testes de suscetibilidade para isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	28
Tabela 3	-	Tratamentos entre os óleos essenciais Alecrim-pimenta (ALP) e Citronela (CTN).....	28
Tabela 4	-	Tratamentos (Sinergismo entre os óleos essenciais Alecrim-pimenta (ALP) e Citronela (CTN).....	29
Tabela 5	-	Compostos fenólicos e bioativos dos óleos essenciais de Alecrim-pimenta (ALP) e Citronela (CTN).....	31

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ALP	Alecrim-pimenta
CRO	Ceftriaxona
CTN	Citronela
CVT	Centro Vocacional Tecnológico
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
LAU	Laboratório de Agricultura Urbana
OE	Óleo essencial
UFC	Universidade Federal do Ceará
UFCG	Universidade Federal de Campina Grande

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\%$	Porcentagem
$\neq$	Diferente
$\leq$	Menor ou igual
$\geq$	Maior ou igual
$\mu$	Micro

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b>	14
2	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b>	16
2.1	Plantas medicinais e óleos essenciais	16
2.2	Uso dos óleos essenciais de Alecrim-pimenta ( <i>Lippia sidoides</i> Cham.) e Citronela ( <i>Cymbopogon nardus</i> )	17
2.3	Caraterização, cromatografia e antioxidantes dos óleos essenciais	20
2.4	Ação antimicrobiana dos óleos essenciais atrelado às bactérias <i>S. aureus</i>	22
3	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	24
4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	31
5	<b>CONCLUSÃO</b>	37
	<b>REFERÊNCIAS</b>	38

## 1 INTRODUÇÃO

Os vegetais têm sido utilizados como alimentos e remédios em toda a história da humanidade, inclusive na era contemporânea, onde as pessoas estão cada vez mais preocupadas em adotar estilos de vida mais saudáveis e mais ligados ao natural. Nesse contexto, destacam-se as plantas medicinais, que são todas aquelas que contêm um ou mais de um princípio ativo, conferindo-lhe atividades terapêuticas. Por esse motivo, o mercado de produtos naturais, como os óleos essenciais, extraídos das plantas medicinais, com potencial de aplicação na conservação de alimentos, tem ganhado destaque frente aos adeptos dos aditivos químicos sintéticos (ALMEIDA, *et al.*, 2020).

Os óleos essenciais são caracterizados quimicamente como misturas complexas de compostos de baixo peso molecular, sendo alguns altamente voláteis, capazes de gerar sabores e/ou aromas, podem ser extraídos de parte de plantas como frutas, flores, cascas, ou de plantas inteiras, como especiarias e ervas medicinais. Parte das propriedades farmacêuticas descritas para plantas medicinais são creditadas aos óleos essenciais (OEs), fisicamente, se apresentam no estado líquido à temperatura ambiente, com aspecto incolor ou claro (MONTEIRO, 2017).

Entre os produtos naturais com potencial terapêutico, tem-se os óleos essenciais (OEs), que são compostos por metabólitos secundários e possuem uma mistura complexa de substâncias voláteis lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, extraídos de diversas partes das plantas, normalmente medicinais. Tais compostos são constituídos, principalmente, por derivados terpênicos como os monoterpenos, diterpenos e sesquiterpenos. Os OEs são utilizados em diversas atividades terapêuticas, in natura ou em preparações farmacêuticas, como efeitos calmantes, anticonvulsivantes, antimicrobiano, fungicida, antioxidante e analgésicos (SIQUEIRA LIMA *et al.*, 2017).

Diversos mecanismos têm sido propostos para explicar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais. Espécies da família Verbenaceae especialmente o gênero *Lippia* L. vêm sendo exploradas também na medicina veterinária, microbiologia, parasitologia, zootecnia e aquicultura, devido ao seu uso potencial e facilidade de produção agrônômica em escala (SOARES; TAVARESDIAS, 2013). Está distribuída geograficamente pelas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste e seus domínios fitogeográficos ocorre em área da Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (SALIMENA; MULGURA, 2015).

Diversas espécies desse gênero, têm sido utilizadas na aquicultura devido ao seu potencial bioativo para o tratamento de doenças parasitárias e bacterianas (SUTILI *et al.*, 2016). O efeito terapêutico de *L. sidoides* se deve principalmente à presença de timol, uma

substância com forte atividade antimicrobiana, que é o principal componente no óleo essencial e extratos da planta. Dentre os microrganismos sensíveis aos extratos ou óleo essencial de *L. sidoides*, destacam-se a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* e *A. hydrophila* (MAJOLO *et al.*, 2020).

Com destaque nos dias de hoje no mercado interno e externo, está também o capim citronela (*Cymbopogon nardus*), pertencente à família Poaceae, sendo oriunda da Índia. Suas folhas são longas e apresentam coloração verde-clara. Pode ser plantada em vasos e jardineiras, chegando a atingir 1,8 m. É utilizada na produção de óleo essencial, que contém o composto citronelal, responsável por propriedades repelentes. Além disso, a sua essência também pode ser utilizada em perfumes, incensos, desinfetantes e armazenagem de alimentos (MEDEIROS, 2020).

Nos últimos anos, tem havido um crescente interesse na avaliação do potencial antioxidante de compostos naturais para a conservação de alimentos, considerando os efeitos indesejáveis que os compostos sintéticos empregados podem causar nos consumidores. O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria gram positiva pertencente ao gênero *Staphylococcus* e à família *Staphylococcaceae*. Geralmente se agrupam em formato de cocos com a aparência de cachos de uva. São imóveis, não esporogênicos, catalase positiva e oxidase usualmente negativa (SILVA, 2017).

Diante disso, o objetivo da pesquisa será avaliar a composição fitoquímica dos óleos essenciais de Alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) e Citronela (*Cymbopogon nardus* ou *Cymbopogon winterianus*) visando sua aplicação e potencial antimicrobiano frente a bactérias patogênicas de origem alimentar.



## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Plantas medicinais e óleos essenciais

Os hábitos sociais mudam ao longo do tempo e com a mudança novos estilos de vida são adotados e velhos costumes são substituídos, no entanto, em toda a história da humanidade os vegetais têm sido usados como alimentos e remédios, inclusive na era contemporânea, onde o consumidor tem valorizado cada vez mais a disponibilidade de produtos cosméticos e alimentícios mais naturais, saudáveis e que possam trazer algum benefício à saúde. Esses fatores têm contribuído para aumentar o interesse na pesquisa de produtos naturais que apresentem atividades biológicas tais como a atividade antimicrobiana (SILVEIRA, *et al.*, 2012).

Planta medicinal é toda aquela que contém um ou mais de um princípio ativo, conferindo-lhe atividade terapêutica (MARTINS *et al.*, 1995). A utilização de plantas medicinais é muito antiga, sabendo-se que, desde 2300 a.C., os Egípcios, Assírios e Hebreus cultivavam diversas ervas e traziam outras de suas expedições. As plantas medicinais e as aromáticas são usadas como medicamentos desde a pré-história (CUNHA, 2012).

Considerada como prática multimilenar e comprovada em diversos trabalhos científicos quanto à sua múltipla diversidade de usos, as plantas medicinais, com suas propriedades bioativas, também são objeto de estudos modernos. Hoje, com a emergência de linhagens de bactérias resistentes à maioria dos antimicrobianos disponíveis, observa-se uma renovação no interesse pela busca de agentes antimicrobianos alternativos e nesse contexto, as plantas medicinais representam uma importante fonte renovável para a busca de outros agentes terapêuticos com potencial terapêutico frente a cepas resistentes. Os principais grupos de metabólitos vegetais com atividade antimicrobiana incluem os alcaloides, taninos, flavonoides e óleos essenciais (SCORZONI, *et al.*, 2016).

Através do estudo da suscetibilidade microbiana, percebe-se que os microrganismos estão sendo capazes de se adaptarem de forma rápida em resposta a pressão ambiental imposta pelos antimicrobianos. Portanto, a busca por novas alternativas terapêuticas se faz necessário. As plantas medicinais tem apresentado uma alternativa quanto a atividade antimicrobiana (EDRIS, 2007; DAGLI *et al.*, 2015; PARENTE-ROCHA *et al.*, 2017).

Entre os produtos naturais com potencial terapêutico, tem-se os óleos essenciais (OEs), que são compostos por metabólitos secundários e possuem uma mistura complexa de substâncias voláteis lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, extraídos de diversas partes das plantas, normalmente medicinais. Tais compostos são constituídos, principalmente, por derivados terpenóides como os monoterpenos, diterpenos e sesquiterpenos. Os OEs são

utilizados em diversas atividades terapêuticas, in natura ou em preparações farmacêuticas, como efeitos calmantes, anticonvulsivantes, antimicrobiano, fungicida, antioxidante e analgésicos (SIQUEIRA LIMA *et al.*, 2017).

Neste aspecto, o mercado de produtos naturais, como os óleos essenciais, com potencial de aplicação na conservação de alimentos, tem ganhado destaque frente aos adeptos dos aditivos químicos sintéticos. As propriedades dos óleos essenciais, como as antimicrobianas e antioxidantes, aumentam as possibilidades de aplicação desses compostos em embalagens ativas, alimentos, inseticidas e produtos de higiene (ALMEIDA, *et al.*, 2020).

Os óleos essenciais, subprodutos do metabolismo secundário das plantas, na natureza, têm a função de proteger a planta contra ataques de predadores, como insetos e microrganismos, além de atrair polinizadores para dispersão de pólenes e sementes. Com características de aroma, cor e funções antissépticas, conferidas por seus constituintes e, armazenados em células secretoras, epidérmicas, cavidades, canais ou tricomas glandulares presentes em todos os órgãos das plantas (BRASIL, 2007; BAKALLI *et al.*, 2008).

Diversos mecanismos têm sido propostos para explicar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais. De modo geral, entende-se que a inibição do crescimento microbiano pelos óleos essenciais seja devida ao dano causado à integridade da membrana celular pelos componentes lipofílicos do óleo essencial, o que acaba por afetar a manutenção do pH celular e o equilíbrio de íons inorgânicos (PETER, 2004).

Segundo Rahman e Kang (2009), o risco de que micro-organismos patogênicos venham a desenvolver resistência aos óleos essenciais é muito baixo, uma vez que esses produtos contêm uma mistura de substâncias antimicrobianas, que atuam por meio de diversos mecanismos. Essa é uma característica vantajosa dos óleos essenciais sobre outros agentes antimicrobianos, que pode trazer benefícios nas diversas áreas passíveis de aplicação. Além disso, na escolha de um óleo essencial para uma determinada aplicação, é importante que seja levado em consideração o micro-organismo de interesse, uma vez que a atividade inibitória foi diferente entre as espécies de um mesmo grupo (SILVEIRA, *et al.*, 2012).

## 2.2 Uso dos óleos essenciais de Alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) e Citronela (*Cymbopogon nardus*)

Métodos alternativos a partir de recursos naturais oriundos de partes de plantas estão sendo utilizados por agricultores familiares por apresentarem ação inseticida, repelência, inibição na alimentação, reguladores de crescimento, como alternativa aos inseticidas sintéticos (SILVA, *et al.*, 2011), como opção de baixo custo e ambientalmente adequada ao

controle de insetos em grãos armazenados pelo seu potencial bioativo, apresentarem baixa toxicidade para o homem e animais, fáceis de serem adquiridos e utilizados (PEREIRA, *et al.* 2008).

Os derivados de alguns vegetais possuem propriedades fungitóxicas e fungistáticas, além de serem caracterizados como metabólitos secundários de plantas, com baixa toxicidade a humanos, sendo amplamente testados no controle *in vitro* e *in vivo* de fitopatógenos, bem como no tratamento de sementes. Exemplo de vegetais com estas propriedades é a *Lippia sidoides* Cham, conhecida vulgarmente como alecrim-pimenta, pertencente à família Verbenaceae, possui forma de vida arbustiva de substrato terrícola e autoctone, mas não é endêmica do Brasil (RODRIGUES *et al.*, 0, e seus domínios fitogeográficos ocorre em área da Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (SALIMENA; MULGURA, 2015). Neste sentido, a bioatividade do gênero *Lippia* já foi comprovada em alguns estudos e indicam a potencialidade dos seus constituintes químicos sobre *Aedes aegypti* (CARVALHO 2003) e insetos em grãos armazenados (LIMA, *et al.*, 2011; CASTRO 2013).

O uso de produtos naturais vem ganhando destaque, pois podem ser fontes promissoras de substâncias bioativas contra parasitos e microrganismos. Além disso, tais produtos não são prejudiciais ao meio ambiente e menos agressivos à saúde do homem, com relação aos resíduos farmacológicos presentes nos alimentos de origem animal. Por isso, espécies da família Verbenaceae especialmente o gênero *Lippia L.* vêm sendo exploradas também na medicina veterinária, microbiologia, parasitologia, zootecnia e aquicultura, devido ao seu uso potencial e facilidade de produção agrônômica em escala (SOARES; TAVARES DIAS, 2013).

Várias propriedades biológicas têm sido atribuídas ao óleo essencial e extratos de *Lippia sidoides* (Cham.) Verbenaceae. Diversas espécies desse gênero, tem sido utilizadas na aquicultura devido ao seu potencial bioativo para o tratamento de doenças parasitárias e bacterianas (HASHIMOTO *et al.*, 2016; SOARES *et al.*, 2016; SUTILI *et al.*, 2016). Dentre as espécies, a *L. sidoides* se destaca em razão da sua forte atividade antibacteriana frente à *A. hydrophila* registrada por Majolo, *et al.*, (2017).

É graças a presença de timol, uma substância com forte atividade antimicrobiana, principal componente no óleo essencial e extratos da planta *L. sidoides*, que se deve, o seu efeito terapêutico (MATOS; OLIVEIRA, 1998; MAJOLO *et al.*, 2017). Dentre os microrganismos sensíveis aos extratos ou óleo essencial de *L. sidoides*, destacam-se a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* e *A. hydrophila* (VERAS *et al.*, 2014; MAJOLO *et al.*, 2017).

Com destaque nos dias de hoje no mercado interno e externo, está também o capim citronela (*Cymbopogon nardus* ou *Cymbopogon winterianus*), devido as suas propriedades medicinais. Isso se deve, em grande parte, a utilização do seu óleo essencial, que vem aumentando significativamente, por suas múltiplas funções, utilizado ainda na indústria farmacológica, nas práticas agronômicas (com adoção de métodos conservacionistas), utilizados como inseticidas, fungicidas, na área da veterinária como carrapaticida e de limpeza como desinfetantes. No entanto, é uma planta ainda pouco conhecida, divulgada e trabalhada (UCKER, 2013).

A citronela de Java (*Cymbopogon winterianus*) é uma planta herbácea e com folhas de margens ásperas, ápice agudo e cespitosa, com altura que pode ultrapassar 1,20 m. Originária da Índia, esta gramínea é conhecida principalmente pelo seu efeito repelente, sendo utilizado principalmente contra melgas e mosquitos. Os colmos são eretos, lisos e semi-lenhosos (UCKER, 2013). O gênero *Cymbopogon* inclui cerca de 30 espécies de gramíneas perenes e aromáticas, sendo a maioria dessas nativas da região tropical do velho mundo (WEI e WEE 2013).

É uma planta Liliopsida, pertencente à família Poaceae (Cronquist, 1988; Gomes & Negrelle, 2003), que representa uma das maiores famílias de plantas, englobando cerca de 500 gêneros e aproximadamente 8000 espécies essencialmente herbáceas, denominadas genericamente de gramíneas. A citronela apresenta duas espécies distintas, *Cymbopogon nardus* var. *lenabatu* (citronela do Ceilão) e *Cymbopogon winterianus* Jowitt (citronela de Java) (UNIVERSITY OF HAWAI, 2013).

Ucker (2013) afirma que a produção de plantas medicinais ou aromáticas pode representar uma alternativa bastante viável em termos de geração de renda, principalmente quando aliadas a rusticidade e capacidade de preservação ambiental e adaptação a sistemas agroecológicos, como ocorre com a Citronela (*Cymbopogon winterianus jowitt*). Esta planta apresenta grande valor econômico, capacidade de produção de óleo essencial, muito utilizado como aromatizante, repelente de insetos e também como bioinseticida na agricultura orgânica entre outros usos.

Vários trabalhos têm sido desenvolvidos relacionados ao óleo essencial da citronela, com efeitos benéficos comprovados em diversas pesquisas como, por exemplo:

- No uso do extrato do óleo do capim Citronela para a produção de bioinseticida a base do hidrolato, como controlador do mosquito da dengue (*Aedes aegypti*) (BORGES *et al.*, 2006);

- Na utilização de óleo essencial para inibição da germinação de sementes da planta daninha picão preto (CORREIA; DURIGAN, 2004); na utilização de óleo como inibidor de crescimento da bactéria fitopatogênica *Sclerotium rolfsii* Sacc em condições laboratoriais (PAIVA *et al.*, 2007); e
- Na ação do óleo essencial para o controle da bactéria *Erwinia carotovora*, mostrando inclusive melhor eficiência do que o antibiótico Tetraciclina (PAIVA *et al.*, 2007); e
- Na utilização do óleo essencial da inibição micelial do fungo fitopatogênico *Rhizoctonia solani* Kuhn, sob condições *in vitro* (SANTOS *et al.*, 2007).

A utilização de óleos essenciais ou extratos botânicos no controle tem sido frequentemente relatado. Diversos trabalhos com óleos essenciais têm indicado o seu potencial no controle de bactérias e de fungos fitopatogênicos (SILVA *et al.*, 2010; DEMUNER *et al.*, 2011; NASCIMENTO *et al.*, 2011).

O óleo da citronela de Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) contém, em média, 65% de geraniol e 35% de citrionelal, enquanto o tipo Ceilão apresenta 55% do primeiro e 10% do segundo. No Brasil, a Citronela de Java foi introduzida em 1946, e encontrou excelentes condições de desenvolvimento, apresenta rendimento de 30 a 40 toneladas de folhas por hectare ano (em dois cortes anuais), com um teor de óleo de 0,6% e, portanto, 180 a 200 quilos de óleo por hectare ano (AZAMBUJA, 2011).

### 2.3 Caracterização, cromatografia e antioxidantes dos óleos essenciais

Definidos principalmente como o produto resultante do arraste a vapor d'água de alguma espécie vegetal, os óleos essenciais, recebem esse nome devido à sua aparência oleosa, mas alta volatilidade. Produzidos no metabolismo secundário das plantas, esses compostos vegetais não são essenciais à vida, no entanto, asseguram características vantajosas ao organismo. As atividades e composições dos óleos variam de acordo com as condições em que os vegetais são produzidos, ou seja, os componentes dos óleos voláteis variam quimicamente entre diferentes classes, incluindo álcoois terpênicos, fenóis, ésteres, terpenóides cetônicos, entre outros (PRADO *et al.*, 2019).

A composição de um óleo vegetal é complexa do ponto de vista químico, pois varia de acordo com as características genéticas e das condições ambientais do vegetal. Por isso, o conhecimento da composição química é fundamental para a indústria, visto que, tendo ciência da influência das condições ambientais e dos métodos extrativos para a obtenção da

composição desejada, pode-se estabelecer padrões de qualidade no plantio, colheita e extração. Além disso, muitos produtos sintéticos similares a óleos essenciais são vendidos atualmente, o que não seria possível sem pesquisas sobre a composição química desses óleos (SIMÕES *et al.*, 2017).

Óleos essenciais, quimicamente, são constituídos de compostos terpênicos e eventualmente de fenilpropanoides, além de grupos álcoois, ésteres, aldeídos e cetonas (SIMÕES *et al.*, 2010). Existem diferentes métodos para realizar a extração de óleos essenciais. Para a escolha da metodologia deve-se avaliar a eficiência, a estabilidade das substâncias a serem extraídas e o custo do processo. O tempo varia dependendo do tamanho do material colhido, da natureza química das substâncias, do solvente, e da utilização ou não de temperatura e agitação (SIMÕES, *et al.*, 2010).

Os óleos essenciais são divididos pela sua composição química em fenilpropanóides (derivados do ácido chiquímico) e terpenóides (derivados do isopreno 9). O primeiro grupo compreende cumarinas, aldeídos aromáticos, propenilbenzenos 4, e alibenzenos, enquanto o segundo é composto por monoterpenos, sesquiterpenos e outros terpenóides. Na indústria, os óleos essenciais são utilizados na área cosmética, devido ao aroma agradável e propriedades antissépticas; no setor alimentício, como aromatizantes, flavorizantes e antioxidantes; e na terapêutica, devido a propriedades farmacológicas que incluem efeitos benéficos no trato gastrointestinal e ações estimulantes ou depressoras no Sistema Nervoso Central (SIMÕES *et al.*, 2017).

Com uma composição química complexa, os óleos essenciais são considerados como fonte de substâncias biologicamente ativas, especialmente quanto aos microrganismos (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Os terpenoides e os compostos fenólicos apresenta atividade antimicrobiana dos óleos essenciais, onde o seu mecanismo de ação está direcionado ao caráter lipofílicos dos componentes, que se acumulam nas membranas provocando a perda de energia das células (TOMAZONI *et al.*, 2014).

A análise cromatográfica gasosa (CG) é uma técnica que permite separar e identificar componentes que seria quase impossível de serem definidas pelos métodos convencionais (CIENFUEGOS, *et al.*, 2000). A combinação da cromatografia de gás com espectrometria de massa (CG/MS) torna essa análise qualitativa ainda mais eficaz, sendo muito utilizados para identificar amostras naturais e biológicas (SKOOG, *et al.*, 2015).

Segundo Bandoni (2008), “a cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa permite realizar em uma só operação, para uma amostra da ordem 1µL, uma análise qualitativa junto com uma indicação das proporções em que se encontram os componentes.

Quando se dispõe de substância padrão, a calibração do equipamento permite uma análise quantitativa exata da amostra”.

Os óleos essenciais possuem importantes aditivos para a indústria cosmética, farmacêutica e alimentícia. Principalmente devido ao seu aroma, são amplamente empregados para perfumar xampus, sabonetes, cremes, entre outros (ANDRADE, 2014). Muito tem se discutido, no contexto científico, sobre a utilização de óleos essenciais no controle do crescimento microbiano. Trabalhos com óleos essenciais têm indicado o seu potencial no controle de bactérias (SILVA *et al.*, 2010; DEMUNER *et al.*, 2011; NASCIMENTO *et al.*, 2011) e de fungos fitopatogênicos.

As substâncias antioxidantes inibem ou diminuem os efeitos desencadeados pelos radicais livres e compostos oxidantes em substratos oxidáveis. No organismo humano, a atividade metabólica produz radicais livres que podem causar danos celulares quando produzidos em excesso, causando um estresse oxidativo (ANDRADE *et al.*, (2012).

Na indústria de alimentos, os antioxidantes sintéticos mais utilizados são o butil-hidroxi-anisol (BHA), 2,6-di-tert-butil-4-hidroxitolueno (BHT), e tert-butil-hidroquinona (TBHQ). Muitos compostos produzidos a partir de plantas têm sido pesquisados a fim da utilização do seu potencial antioxidante, que permitirão a substituição dos antioxidantes sintéticos ou então a sua associação, visando diminuir sua quantidade nos alimentos (ANDRADE, 2012).

#### 2.4 Ação antimicrobiana dos óleos essenciais atrelado às bactérias *S. aureus*

A Organização Mundial de Saúde relata essa resistência de microrganismos como um dos problemas mais graves que enfrentamos hoje, ocasionada pelo abuso de antibióticos (ROCHA, 2015). Somado a essa questão, a utilização de óleos essenciais no controle do crescimento microbiano tem sido frequentemente relatada. Trabalhos com essas substâncias têm indicado o seu potencial no controle de bactérias e de fungos fitopatogênicos (SILVA *et al.*, 2010; NASCIMENTO *et al.*, 2011) devido à resistência aos medicamentos antimicrobianos (BOBADILLA *et al.*, 2020).

O uso de compostos sintéticos para a conservação de alimentos vem apresentando efeitos indesejáveis aos consumidores, aumentando a atenção para a utilização de compostos de origem natural. Óleos essenciais são compostos voláteis aromáticos contidos em vários órgãos vegetais, sendo associados ao metabolismo secundário, as quais as plantas produzem mediante necessidades não nutricionais, com fins de sobrevivência no seu ecossistema fornecendo proteção contra micro-organismos e predadores (SIANI *et al.*, 2013).

Nos últimos anos, tem havido um crescente interesse na avaliação do potencial antioxidante de compostos naturais para a conservação de alimentos, considerando os efeitos indesejáveis que os compostos sintéticos empregados podem causar nos consumidores (GOUNDER; LINGAMALLU, 2012). Com isso, algumas bactérias que eram sensíveis a drogas rotineiramente utilizadas, se tornaram cepas resistentes a várias drogas disponíveis no mercado. Evidenciando a necessidade da pesquisa de novos compostos com atividade antimicrobiana (SANTANA *et al.*, 2018).

O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria gram positiva pertencente ao gênero *Staphylococcus* e à família *Staphylococcaceae*. Geralmente se agrupam em formato de cocos com a aparência de cachos de uva. São imóveis, não esporogênicos, catalase positiva e oxidase usualmente negativa. Por serem quimioorganotróficos, apresentam metabolismo de carboidratos respiratórios e fermentativos. São susceptíveis à lise por lisostafina e resistentes à lisozima. Predominantemente associados à pele, glândulas e mucosas de animais de sangue quente (SILVA, 2017).

São aeróbios ou anaeróbios facultativos e crescem em ambientes a temperaturas estabelecidas entre 18 e 40°C e com elevado teor de cloreto de sódio (10%). O diâmetro da sua célula situa-se entre 0,5 e 1,5µm e, pelo menos, 11 sorotipos possuem em sua estrutura cápsula de natureza polissacarídea, onde os sorotipos 6 e 7 são os mais associados às infecções em seres humanos (COSTA, 2018).

Podem provocar doenças que vão desde uma infecção simples, como espinhas e furúnculos, até as mais graves, como pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico e septicemia, fazem parte da microbiota humana. Nos seres humanos, são as bactérias mais frequentemente encontradas na mucosa nasal, a partir das quais contamina as mãos, desempenhando papel importante na disseminação de infecções através dos alimentos (ALMEIDA, *et al.*, 2016).

Por serem um dos principais problemas de saúde pública, e classificados como um dos principais agentes patogênicos causadores de enfermidades ligadas aos animais humanos (Alegre *et al.*, 2016), a busca por opções para o controle do seu desenvolvimento utilizando métodos alternativos vêm sendo bastante pesquisado.



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em duas etapas, no qual a primeira etapa ocorreu no Laboratório de Agricultura Urbana (LAU) da Universidade Federal do Ceará (UFC) e a segunda etapa no Centro Vocacional Tecnológico (CVT) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Campus de Pombal na Paraíba.

#### Coleta do material vegetal

A coleta das folhas de Capim citronela (*C. winterianus*) e Alecrim-pimenta (*Lippia origanoides*) em estágio de atividade fotossintética por volta das 10 horas da manhã. A coleta foi realizada de forma manual com o auxílio de tesoura, em sequência, o material foi cortado em tamanho uniformes entre 10 a 15 cm. Em seguida, o material vegetal foi submetido a secagem natural em bandejas de polietileno em ambiente sombreado por um período de 48 horas. Após a secagem o material foi separado e pesado consolidando amostras de 180-200 gramas. O capim citronela foi coletado na Fazenda Novo Horizonte – CE e o Alecrim-pimenta na Fazenda Experimental do Vale do Curu da UFC.

#### Extração do óleo essencial

O processo de extração dos óleos essenciais foi realizado no Laboratório de Agricultura Urbana (LAU). A destilação foi efetuada por meio de um modelo de extração por arraste de vapor d'água.

A extração do óleo essencial ocorreu por arraste a vapor, durante o período de tempo de uma hora cada extração, o óleo essencial foi separado do hidrolato por partição líquido-líquido (KOKETSU; GONÇALVES, 1991). No qual em cada extrator foi colocado 180-200 gramas de folhas. Após o processo de extração, foi realizada a identificação dos constituintes individuais que será realizada por cromatografia gasosa / espectrometria de massa (GC / MS).

Os componentes serão quantificados após normalização das áreas e expressos como uma porcentagem da área total (% abundância relativa) (ADAMS, 2007). Com a quantificação dos constituintes, verificou-se, no óleo essencial de *Lippia origanoides*, mais de 30 compostos, sendo as substâncias encontradas em maior percentual: o Timol (71,54 %), Ocymene (11,41%), Caryophyllene (4,32%), Myrcene (2,03%), Thymol methyl ether (1,23%) e Y-terpinene (1,19%). Os principais constituintes do óleo de capim citronela foram Citronellal (35,39%), Geraniol (28,63%), Citronellol (11,15%), Elemol (5,57%),  $\alpha$ -cadinol (2,40%), D-limonene (2,18%), entre outros.

## Análises laboratoriais

### Compostos Fenólicos

A determinação de fenólicos totais foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu, descrito por Waterhouse (2006), foi realizada a diluição de 1:50 dos óleos essenciais de Alecrim – pimenta e Citronela com água destilada, a partir desta solução foi adicionada água, Folin- clocalteu e carbonato de sódio, aquecidos em banho maria a 40°C por 30 min, e em seguida foi medida a absorbância a 765nm. Foi obtida uma curva padrão nas concentrações de 4,5 a 27 (µg/mL), o teor é expresso em mg equivalente de ácido gálico (mgEAG/g).

### Clorofila Total e Carotenoides Totais

A determinação de clorofila total e carotenoides totais conforme o método descrito por Lichtenthaler (1987), na qual pesou-se 1g de amostra, adicionada 0,2g de carbonato de cálcio (CaCO<sub>3</sub>) e cerca de 3mL de acetona 80%, foi macerado por 2 minutos em ambiente escuro e, posteriormente, adicionado mais 2mL de acetona 80% para lavar o resíduo do almofariz totalizando 5 mL. A solução obtida foi acondicionada em tubos de ensaios envolvidos com papel alumínio e centrifugadas por 10 minutos a 10° C e 3000 rpm em centrifuga refrigerada modelo (NT 815). A quantificação para leitura em espectrofotômetro modelo (Spectrum SP – 1105) nos comprimentos de onda de 470nm, 646nm e 663nm.

As concentrações foram quantificadas pelas seguintes equações:

#### Clorofila a

$$(\text{mg}/100\text{g}) = [(12,21 \cdot A_{663} - 2,81 \cdot A_{646}) / \text{massa}(\text{g})] \cdot 0,1 \quad (\text{Equação 1})$$

#### Clorofila b

$$(\text{mg}/100\text{g}) = [(20,13 \cdot A_{646} - 5,03 \cdot A_{663}) / \text{massa}(\text{g})] \cdot 0,1 \quad (\text{Equação 2})$$

#### Clorofila Total

$$(\mu\text{g}/100\text{g}) = [(17,3 \cdot A_{646} + 7,18 \cdot A_{663}) / \text{massa}(\text{g})] \cdot 100 \quad (\text{Equação 3})$$

#### Carotenoides Totais

$$(\mu\text{g}/100\text{g}) = [(1000 \cdot A_{470} - 1,82 \cdot Ca - 85,02 \cdot Cb) / 198] \quad (\text{Equação 4})$$

### Flavonoides e antocianinas

A determinação seguiu o método de Francis (1982) no qual pesou-se 1g/mL de amostra, foi macerada por 2 minutos juntamente com 5mL de Etanol: HCl, e em seguida, adicionado mais 5mL de Etanol: HCl para lavar o almofariz, totalizando 10 mL. Foram adicionados em tubos de ensaio envolvidos por papel alumínio e acondicionados por 24 horas

sob refrigeração, logo após, realizada as leituras em espectrofotômetro modelo (Spectrum SP – 1105) a 374nm para flavonoides e 535 nm para antocianinas. As concentrações foram quantificadas pelas equações:

$$\text{Flavonoides (mg/100g)} = Fd * A_{374} / 76,6 \quad (\text{Equação 5})$$

$$\text{Antocianinas (mg/100g)} = Fd * A_{535} / 98,2 \quad (\text{Equação 6})$$

Onde:  $Fd = 100 / (\text{massa(g)} / \text{Volume da diluição(mL)})$

Atividade antimicrobiana frente a bactéria *Staphylococcus aureus*

Ativação da bactéria *Staphylococcus aureus*

A cepa bacteriana de *Staphylococcus aureus* utilizada nos testes foi cedida pela Fundação Oswaldo Cruz, onde a mesma faz parte da Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária (Tabela 1).

Para o procedimento de ativação utilizou-se a solução salina a 0,85g/mL, e após o período de adaptação do microrganismo, foi normalizada para uma concentração com base no padrão 0,5 da escala de McFarland ( $1,0 \times 10^8$  UFC/mL) e feita a repicagem em meio de cultura Ágar Mueller-Hinton (Difco). Posteriormente, incubadas invertidas em estufa a 35 °C por 48 horas. E logo após, seguiu-se para os testes de susceptibilidade.

Tabela 1 - Informações sobre a cepa de *S. aureus* utilizada na pesquisa de acordo com INCQS/CMRVS/FIOCRUZ.

Nº de acesso no INCQS*	Nº de acesso na ATCC^	Origem	Microrganismo
00188	ATCC	SSI VI	<i>S.aureus</i>

Fonte: Elaborado com base em dados obtidos do INCQS/CMRVS/FIOCRUZ (2021).

\*Número de identificação da cepa no INCQS; ^ Número de identificação da cepa no American Type Culture Collection.

Teste de susceptibilidade por Difusão em discos

O teste de susceptibilidade seguirá o protocolo M100-S15 (CLSI, 2005). Determinada pela técnica de difusão em disco executada no laboratório de microbiologia do CVT/UFCG, onde consiste na confecção dos discos a partir de papel filtro com diâmetros de 6mm, devidamente autoclavados e acondicionados em frascos estéreis.

Os discos foram embebidos com auxílio de micropipeta calibrada (Dignet), com uma

quantidade de 5µL, 10 µL e 15 µL dos óleos essenciais. Foi utilizado a Ceftriaxona (30 mcg) antibiótico padrão contra a ação da atividade do *Staphylococcus aureus* como controle positivo e o álcool 70% como controle negativo.

Para o desenvolvimento da técnica de difusão em disco foi utilizado o meio de cultura Ágar Mueller-Hinton (Difco). As placas foram incubadas invertidas, em estufa a 35°C, em 15 minutos após a aplicação dos discos. Os ensaios foram feitos em triplicata, e após 24 horas de incubação foi realizada a medição dos halos, usando um paquímetro digital e feita a interpretação de acordo com a Tabela 2.

#### Teste de susceptibilidade por Difusão em poços

Realizado com adaptações da metodologia de Silva e Sonehara (2018), onde consiste em perfurações no meio ágar para formação de pequenos poços. Com auxílio de uma pipeta de 5mL esterilizada, foram formados os poços com diâmetros regulares. Os poços serão preenchidos com 5µL, 10 µL e 15 µL dos óleos essenciais, antibiótico e álcool, posteriormente, foram levados a estufas 35°C por 24 horas. A leitura foi realizada com um paquímetro digital para medição dos halos e interpretada de acordo com a Tabela 2.

**Tabela 2** - Critérios de interpretação para determinação de testes de suscetibilidade para isolados de *Staphylococcus aureus*.

Sustância avaliada	Sensível (S)	Intermediário	Resistente (R)
CEFTRIAXONA (CRO 30 mcg)	≤13	14 – 20	≥20

Fonte: CLSI (2005).

#### Manipulação dos óleos essenciais

Inicialmente foi utilizado o ricinoleato de sódio como emulsionante do óleo na proporção (1:3 v/v). Logo em seguida será pipetado nos discos e poços em três diferentes concentrações (5, 10 e 15 µL), nas concentrações de (ALP e CTN), os valores mínimo, intermediário e máximo foram baseados nas concentrações comumente utilizadas na literatura para óleos essenciais. Para averiguar o sinergismo entre os óleos essenciais utilizados, será

feito combinações binárias dos óleos que serão impregnadas nos discos e nos poços, de forma que, as somas desses óleos permanecessem nas mesmas concentrações dos óleos (5, 10 e 15  $\mu\text{L}$ ), assim, para cada óleo.

**Tabela 3.** Tratamentos entre os óleos essenciais Alecrim-pimenta (ALP) e Citronela (CTN).

	(ALP)	(CTN)
	<b>Concentração</b>	
	5 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$
DISCOS	10 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$
	15 $\mu\text{L}$	15 $\mu\text{L}$
	5 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$
POÇOS	10 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$
	15 $\mu\text{L}$	15 $\mu\text{L}$
	5 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$

**Tabela 4.** Tratamentos (Sinergismo entre os óleos essenciais Alecrim-pimenta (ALP) e Citronela (CTN)).

	ALPXCTN	
	<b>Concentração</b>	
	5 (1/2) $\mu\text{L}$	
	5 (2/1) $\mu\text{L}$	
DISCOS	10 (1/2) $\mu\text{L}$	

	10 (2/1) $\mu\text{L}$
	15 (1/2) $\mu\text{L}$
	15 (2/1) $\mu\text{L}$
	15 $\mu\text{L}$ (1:1)
	5 (1/2) $\mu\text{L}$
<b>POÇOS</b>	5 (2/1) $\mu\text{L}$
	10 (1/2) $\mu\text{L}$
	10 (2/1) $\mu\text{L}$
	15 (1/2) $\mu\text{L}$
	15 (2/1) $\mu\text{L}$
	15 $\mu\text{L}$ (1:1)

### Delineamento experimental

O delineamento adotado foi o delineamento integralmente casualizado (DIC) em esquema fatorial. Para avaliar os óleos isolados (3 concentrações, 2 óleos e 2 métodos) com 4 repetições e o sinergismo (7 concentrações e 2 métodos) com 4 repetições, além de controle positivo e negativo.

Os resultados encontrados nas análises da caracterização cromatográfica, compostos fenólicos e bioativos foram avaliados de acordo com a estatística descrita (média e desvio padrão), com o auxílio do software Microsoft Office Excel 2017 e para verificar a existência de diferença entre os resultados.

O efeito da dosagem dos óleos de Alecrim-Pimenta e Citronela sobre o tamanho do

halo de inibição gerado sobre o meio de cultura aplicando-se regressões quadráticas, tanto para os dados do experimento com discos quanto com poços. As misturas em suas diferentes doses foram comparadas com as testemunhas negativas e positivas e com os óleos utilizando-se o teste PERNAMOVA de duas vias com 9.999 permutações. Em seguida, os tratamentos serão testados par-a-par pelo teste post-hoc de Mann-Whitney.

Testes não-paramétricos serão utilizados caso os dados não satisfaçam os pressupostos de testes paramétricos, especialmente o fato de haver tratamentos com ausência de variância. As análises serão realizadas nos softwares R 4.0.2 (R Core Team, 2020) e Past 4.06b (Hammer *et al.*, 2001). Adotaremos o valor crítico de 5% de probabilidade de erro em todos os testes.

### **Variáveis analisadas**

Avaliou-se os compostos dos óleos essenciais Alecrim-Pimenta e Citronela, através de análises cromatografia gasosa, compostos bioativos, compostos fenólicos e o potencial antimicrobiano frente a bactéria patogênica *S. aureus*.

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os compostos voláteis encontrados após a extração dos óleos essenciais de Capim citronela e Alecrim pimenta foram: Citronelal (71,54%), Geraniol (28,63%), Citronelol (11,15%), Elemol (5,57%),  $\alpha$ -Cadinol (2,40%), D-Limoneno (2,18%) e o Timol (71,54 %), P-cimeno (11,41%),  $\beta$ -cariofileno (4,32%), Mirceno (2,03%), Éter metil timol (1,23%) e Terineno (1,19%) entre outros. Os óleos essenciais de *C. winterianus* apresentaram como compostos majoritários o citronelal, geraniol e o citronelol índices que representam um quantitativo satisfatório quando comparado a outras regiões. O citronelal é um dos compostos mais requisitados pela indústria principalmente pelo potencial repelente, antioxidante e antimicrobiano (KRIS & BUCHBAUER, 2006; KWON *et al.*, 2010; LU *et al.*, 2014).

Resultados parecidos foram encontrados por outros autores que relataram que a maior concentração de citronelal pode ocorrer devido a oxidação do citronelol que é um álcool secundário em citronelal (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Diante disso, os constituintes e as concentrações relativas podem variar de acordo com a espécie e a parte da planta que é coletada. Outros fatores podem ser levados em consideração como as condições climáticas, destilação e estocagem do material.

**Tabela 5.** Compostos fenólicos e bioativos dos óleos essenciais de Alecrim-pimenta (ALP) e Citronela (CTN)

Compostos	Óleos essenciais (mg/100g)	
	ALP	CTN
Clorofila a	0,17 $\pm$ 0,01	0,24 $\pm$ 0,04
Clorofila b	0,53 $\pm$ 0,06	0,25 $\pm$ 0,02
Clorofila total	0,71 $\pm$ 0,06	0,49 $\pm$ 0,06
Carotenoides totais	41,68 $\pm$ 4,91	21,78 $\pm$ 1,33
Flavonoides	14,89 $\pm$ 0,64	13,50 $\pm$ 0,02
Antocianinas	1,06 $\pm$ 0,01	6,03 $\pm$ 0,03
Compostos fenólicos	0,32 $\pm$ 0,02	0,79 $\pm$ 0,06

Médias e desvios padrões ( $\pm$ ) dos compostos bioquímicos analisados nos óleos essenciais de Alecrim-Pimenta e Citronela



A composição encontrada no óleo essencial *Lippia origanoides* destaca-se os compostos majoritários o timol, p-cimeno e  $\beta$ -cariofileno. O timol é um fenol monoterpênico mais encontrado na família Verbenaceae destaca-se por fornecer composição química que atuam como ação óleos antioxidante, anti-inflamatória, anestésica local, cicatrizante, antisséptica e com destaque para propriedades antibacterianas e antifúngicas (PINHEIRO, 2021). O óleo essencial *Lippia* possui grande potencial bioativo, pois são abundantes em timol substâncias consideradas responsáveis pela eficaz atividade antimicrobiana (BETANCOURT et al., 2019).

Na Tabela 5, encontram-se os valores médios referentes às caracterização dos compostos fenólicos e bioativos dos óleos essenciais de capim citronela e alecrim pimenta. Os compostos médios correspondentes a Clorofila a apresentaram valores próximos entre os óleos essenciais. Resultados encontrados por Rodrigues (2019) que os valores semelhantes podem ser explicados devido influenciadas por diferentes fontes de adubação e as respostas fisiológicas, bem como o volume de óleo essencial produzido em uma determinada quantidade de matéria seca. A clorofila b encontrada no óleo essencial de Alecrim pimenta foi superior a composição do óleo essencial de Capim citronela.

Os flavonoides são substâncias naturais com estruturas fenólicas variáveis e possui a capacidade de atuar em como antioxidantes sequestradores de radicais. Nos óleos essências de ALP e CTN foi encontrado um teor de 14,89 e 13,50 (mg/100g) respectivamente. Estudos com os respectivos óleos essenciais foi constatado que o gênero *Lippia* são fonte de bioativos com potencial para aplicação em cosméticos, alimentos e produtos farmacêuticos principalmente por apresentar a presença de flavonoides naringenina e pinicembrina (PASCUAL et al., 2001; ALMEIDA et al., 2010; STASHENKO et al., 2010; SOUZA et al., 2019).

Nos resultados encontradas as antocianinas apresentaram 1,06 e 6,03 (mg/100g) para os óleos essenciais de ALP e CTN respectivamente. Embora os seus mecanismos de ação sejam pouco conhecidos sua composição química estabelece relação com propriedades nutracêuticas, principalmente, por estarem associadas aos pigmentos que geralmente são estáveis que podem ser degradados, sob a ação da vitamina C, oxigênio, temperatura, pH do meio entre outros (ARTÉS-HERMANDEZ et al., 2006; LIMA et al., 2007). O óleo essencial de CTN possui alta concentração de antocianinas em sua composição química comparada ao óleo essencial de ALP.

Dentre os valores encontrados na composição química dos óleos essenciais para compostos fenólicos o óleo essencial de CTN possui 0,79 e o ALP 0,32 (mg/100g). Em

pesquisas realizadas por Oliveira (2011) foi estabelecido que os compostos fenólicos são substâncias que possuem anel aromático, podendo fazer parte de um ou mais grupos de hidrofílicos, incluindo os grupos funcionais entre eles: fenóis simples, flavonoides, ácidos fenólicos, ligninas, taninos entre outros.

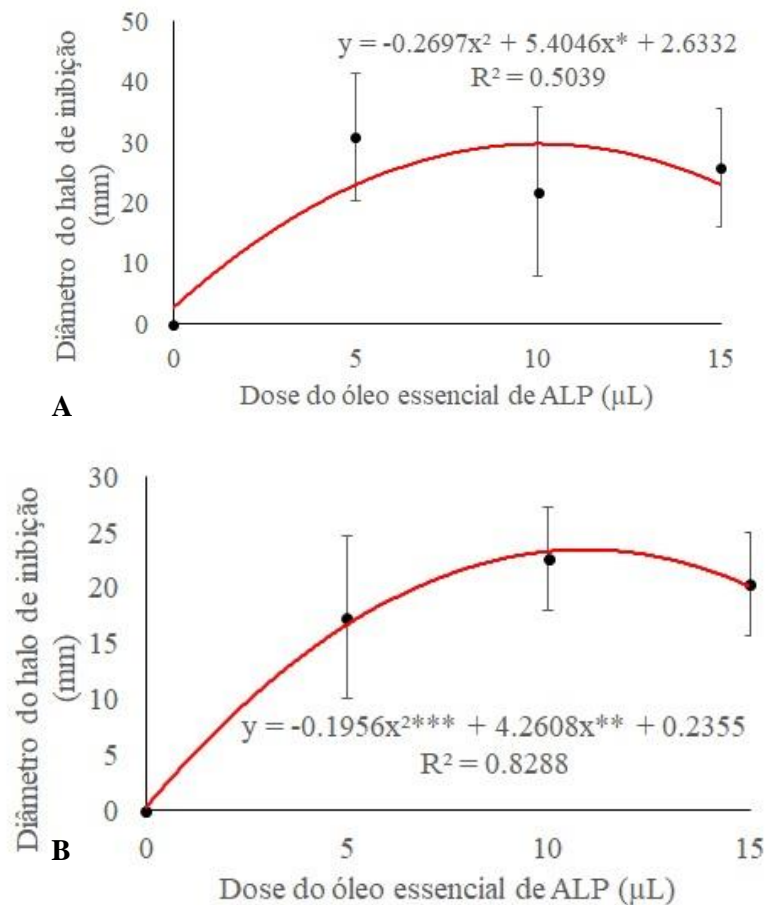
Os efeitos das diferentes doses dos óleos essenciais diferiram significativamente dos controles positivo (antibiótico comercial) e negativo, tanto no experimento com discos quanto com poços ( $p = 0,0001$ ). No entanto, não foi encontrada interação significativa entre as variáveis tratamento (óleo e controles) e doses ( $p = 1$ ).

Todos as doses de ambos os óleos, tanto puros quanto nas misturas em diferentes proporções e em ambos os tipos de experimentos (discos e poços), apresentaram halos de inibição significativamente superior que ao controle negativo e não diferiram do controle positivo (Figuras 5 a 8). Assim, ambos os óleos, puros ou em mistura, podem substituir o antibiótico inclusive na dose mais baixas testadas ( $5\mu\text{L}$ ).

Os efeitos das diferentes doses dos óleos puros diferiram significativamente dos controles positivo (antibiótico comercial) e negativo, tanto no experimento com discos quanto com poços ( $p = 0,0001$ ; Tabelas 3 e 4). No entanto, não foi encontrada interação significativa entre as variáveis tratamento (óleo e controles) e doses ( $p = 1$ ).

A Figura 1 expressa os dados sobre a influência de diferentes doses do óleo essencial de alecrim pimenta sobre o halo de inibição de *S. aureus* para os ensaios realizados em discos (A) e em poços (B). Em relação ao efeito inibitório do óleo essencial, nota-se que a concentração de  $5\mu\text{l}$  já é capaz de provocar efeitos positivos sobre o halo de inibição, para ambos tratamentos (disco e poços), todavia, usando a concentração de  $10\mu\text{l}$  é possível obter a máxima eficiência do óleo, uma vez que, os dados demonstram que concentrações acima de  $10\mu\text{l}$  já demonstra uma declínio na curva de inibição. Precisamente as doses de ALP estimada através da equação de regressão nas concentrações de 10,89 para ensaio em discos e 10,02 para ensaio em poços, são as mais indicadas para se alcançar a maior inibição.

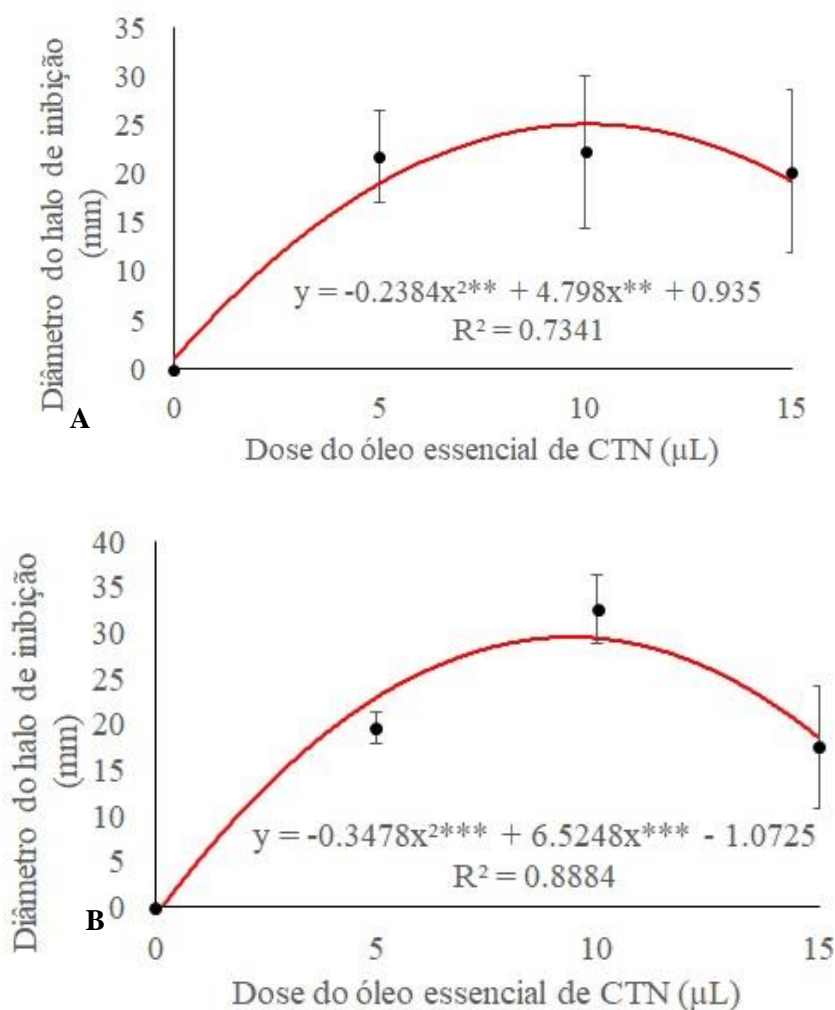
**Figura 1.** Efeito das doses do óleo de ALP sobre o diâmetro do halo de inibição no experimento com discos (A) e em poços (B)



Em relação aos dados do óleo essencial de CTN é possível notar um comportamento similar ao óleo de alecrim pimento, isso porque, a dose de 10  $\mu\text{L}$  também foi a responsável pelos maiores valores de inibição do crescimento de *S. aureus*, assim como, concentrações de OE's acima de 10  $\mu\text{L}$  podem ter seus efeitos reduzidos. Os dados sobre a dose estimada para alcançar a maior inibição fundamentado na reta da equação de regressão os valores das doses indicadas são de 10,06 para ensaios em disco e 9,38 para ensaio em poços.

Diante do exposto, a literatura já dispõe de informações e dados consolidados acerca da capacidade bactericida e efeito bacteriostático dos óleos essenciais. Dessa forma, Machado et al., 2011, notificou que *S. aureus* é altamente suscetível à diversos óleos essenciais, posto isto, trabalhos como o de Magueroski e Assolini (2023) usando o óleo essencial de *Allium schoenoprasum*, e Kryvtsova et al. (2020) trabalhando com OE's de *Origanum vulgare* L. também encontraram resultados promissores na inibição de *S. aureus*.

**Figura 2.** Efeito das doses do óleo de CTN sobre o diâmetro do halo de inibição no experimento com discos (A) e em poços (B)



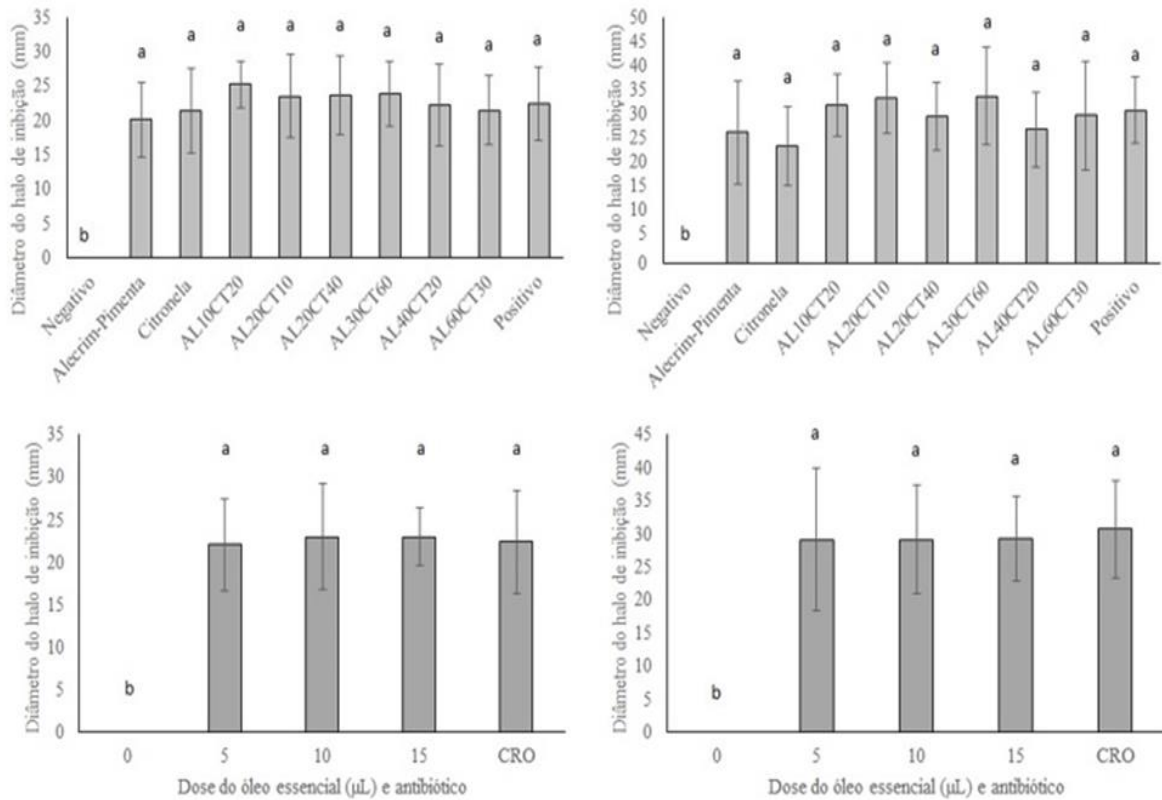
A Figura 2 (A) compara a ação das diferentes doses de óleo essencial de CTL com o antibiótico Ceftriaxona. Onde, com base no teste de tukey 5% não houve diferença estatística, obtendo-se médias similares no que diz respeito à inibição de *S. aureus* no ensaio em discos, bem como no ensaio em poços (Figura 2 (B)) quando comparado ao uso do antibiótico. Isso implica dizer que o óleo essencial de CTL é tão eficiente quanto a quimioterápico usado.

Além disso, nesse estudo também foi avaliado o efeito da interação entre os óleos essenciais de ALP e CTN em diferentes proporções, bem como sua aplicação de forma isolada, contrastadas ao uso do quimioterapia a base de Ceftriaxona, dessa forma, não houve diferença estatística entre os tratamentos, exceto com o controle negativo. Isso sugere que os resultados demonstram o efeito extraordinário de ambos os óleos e suas combinações na inibição *S. aureus*.

Essa descoberta é crucial para auxiliar no gerenciamento e controle do microrganismo em questão, uma vez que, a resistência dos microrganismos à moléculas químicas tem se tornado recorrente. Para isso é necessário que trabalhos posteriores sejam realizados visando

maximizar a eficiência da extração e utilização dos óleos de ALP e CTN, além de procurar entender os mecanismos bioquímicos envolvidos na inibição dos microrganismos, assim como, realizar testes em diferentes microrganismos.

**Figura 3.** Efeito das doses do óleo de ATN e CTN e combinações.



Apesar disso, Barreto et al. (2014) relata que o efeito deletério do óleo essencial de *Lippia sidoides* está associado a sua capacidade altamente lipofílica sobre a membrana plasmática dos microrganismos, portanto, afetando a integridade da membrana e favorecendo a permeabilidade de íons de  $K^+$  e  $H^+$ , gerando gradiente osmótico que culmina na lise e morte das células

## 5 CONCLUSÃO

Os resultados indicam a presença de importantes compostos voláteis em óleos essenciais extraídos Alecrim-pimenta e Citronela podem ser amplamente utilizado pela indústria devido às suas propriedades repelentes, antioxidantes e antimicrobiana.

Os óleos essenciais de ALP e CTN usada de forma isolada ou combinada foram eficientes na inibição de *S. aureus*, além disso, a eficácia dos óleos foi comparada à adoção de quimioterapia, onde a capacidade inibitória dos OE's foi semelhante ao do antibiótico, sendo assim, podendo servir como uma terapia promissora alternativa ao uso de químicos, uma vez que, os OE's podem ajudar a prevenir o surgimento de resistência nos microrganismos.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. 4. ed. Illinois: Allured Publishing Corporation, 2012.
- ALEGRE, M. L., CHEN, L., DAVID, M. Z., BARTMAN, C., SUSAN B.V., KUMAR, N., CHONG, A. S., & DAUM, R. S. Impact of *Staphylococcus aureus* USA300 Colonization and Skin Infections on Systemic Immune Responses in Humans. **The Journal of Immunology**, [s.l.], v. 197, n. 4, p. 1118-1126, 2016.
- ALMEIDA, M. C. S.; ALVES, L. A.; SOUZA, L. G. S.; MACHADO, L. L.; MATOS, M. C.; OLIVEIRA, M. C. F.; LEMOS, T. L. Flavonoides e outras substâncias de *Lippia sidoides* e suas atividades antioxidantes. **Química Nova**, [s.l.], v. 33, n. 9, p.1877-1881, 2010.
- ANDRADE, A. M.; SANTOS, M. S.; ANDRADE, M. R.; ANDRADE, R. S. G.; JÚNIOR, C. G. S.; Mapeamento Tecnológico da utilização de óleos essenciais para a produção de cosméticos. **Caderno Prospecção**, Salvador, v. 7, n. 3, p. 416-420, 2014.
- ARTÉS-HERNAÁNDEZ, F.; TOMAS-BARBERÁN, F. A. Modified atmosphere packa ging preserves quality of So<sub>2</sub>-free ‘Superior seedless’ table grapes. **Postharvest Biology and Technology**, [s.l.], v. 39, n. 2, p. 146-154, 2006.
- AZAMBUJA, W. **Química do óleos essenciais e número de CAS**. 2011. W. Timol. Disponível em:[http://oleosessenciais.org/category/padroes\\_tipos/padroes/q\\_t\\_padroes/timol/](http://oleosessenciais.org/category/padroes_tipos/padroes/q_t_padroes/timol/). Acesso em: 26 jun. 2021
- BAKALLI, F; AVERBECK ,S; AVERBECK, D; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, [s.l.], v. 46, n. 2, 446-475, 2008.
- BARRETO, H. M. et al. Effect of *Lippia origanoides* H.B.K. essential oil in the resistance to aminoglycosides in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **European Journal of Integrative Medicine**, Germany, p. 1-16, 2014.
- BETANCOURT, L. et al. Effects of Colombian oregano essential oil (*Lippia origanoides* Kunth) and *Eimeria* species on broiler production and cecal microbiota. **Poultry Science**, [s.l.], v. 98, n. 10, p. 4777–4786, 2019.
- BOBADILLA, F. J.; NOVOSAK, M. G.; WINNIK, D. L.; KACHUK, A. V.; LACZESKI, M. E.; QUIROGA, M. I. Antibacterial activity and toxicity of the ethanolic extract of *Eugenia Uniflora* L. Leaves On *Pseudomonas Aeruginosa*. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, [s.l.], v. 8, n. 2, p. 842–846, 2018.
- BORGES, N. S. S. et al. **Controle do *Aedes aegypti* com bioinseticida a base do hidrolato de *Lippia sidoides* e *Cymbopogon winterianus* no bairro Centro**, Pentecoste-Ce. 2006. Disponível em: <http://www.abhorticultura.com.br/biblioteca/Default.asp?id=6810>. Acesso em: 26 jun. 2021
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 2, de 15 de janeiro de 2007: Aditivos aromatizantes produzidos e comercializados nos territórios dos Estados Partes do MERCOSUL. Ministério da Saúde: Anvisa, p. 19, 2007.

CARVALHO, A.F.U., V.M.M. MELO, A.A. CRAVEIRO, M.I.L. MACHADO, M.B. BANTIM & E.F. RABELO. Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. Against *Aedes aegypti* Linn. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s.l], v. 98, p. 569-571, 2003.

CASTRO, M. J. P. **Efeito de genótipo de feijão-caupi e de espécies botânicas em diferentes formulações sobre *Callosobruchus maculatus* (Fabr.)**. Tese (Doutorado em Agronomia - Proteção de Plantas). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômica. 131 f. 2013.

CIENFUEGOS, F.; VAITSMAN, D. **Análise Instrumental**. Rio de Janeiro: Editora Interciência Ltda, 2000.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Normas de desempenho para testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para crescimento de bactérias aeróbias. 15th suplemento informativo. **CLSI documento M100-S15**, v. 25, n.1, 2005.

CORREIA, N. M.; DURIGAN, J. C. Emergência de plantas daninhas em solo coberto com palha de cana-de-açúcar. **Planta Daninha**, [s.l], v. 22, n. 1, p. 11-17, 2004.

COSTA, C. M. F. C. G. **Resistência aos antibióticos em *Staphylococcus aureus*: uma revisão**. 2018. 100 f. Dissertação (Mestrado integrado em Medicina) Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Coimbra, 2018.

CRONQUIST, A. The evolution and classification of lowe ring plants. 2 ed. New York, **The New York Botanical Garden**, p. 279, 1988.

CUNHA, A.P. **O emprego das plantas aromáticas desde as antigas civilizações até o presente**. 2012. Disponível em: <http://antoniopcunha.com.sapo.pt>. Acesso em: 21 abr. 2021.

DAGLI, N. et al. Essential oils, their therapeutic properties, and implication in dentistry: **A review. Journal of International S. P. and Community Dentistry**, [s.l], v. 5, n .5, p. 335-340, 2015.

DE ALMEIDA, Jhenyfer Caroliny; DE ALMEIDA, Priscilla Prates; GHERARDI, Sandra Regina Marcolino. Potencial antimicrobiano de óleos essenciais: uma revisão de literatura de 2005 a 2018. **Revista eletrônica - NUTRITIME**, [s.l], v. 17, n. 1, 2020.

DEMUNER, A.J. et al. Seasonal variation in the chemical composition and antimicrobial activity of volatile oils of three species of *Leptospermum* (Myrtaceae) grown in Brazil. **Molecules**, [s.l], v. 16, p. 1181-1191, 2011.

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytotherapy Research**, [s.l], v. 21, n. 4, p. 308- 323, 2007.

FRANCIS, F. J. Analysis of anthocyanins. In: MARKAKIS, P. (ed.). **Anthocyanins as food colors**. New York: Academic Press, [s.l], v. 2, p. 181-207. 1982.

GOMES, E. C.; NEGRELLE, R. R. B. *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf: Aspectos botânicos e ecológicos. **Visão Acadêmica**, [s.l], v. 4, p. 137-144, 2003.

GOUNDER, D. K.; LINGAMALLU, J. Comparison of chemical composition and antioxidant



potential of volatile oil from fresh, dried and cured turmeric (*Curcuma longa*) rhizomes. **Industrial Crops & Products**, [s.l], v. 38, p. 124–131, 2012.

HASHIMOTO, G. S. O.; MARINHO NETO, F.; RUIZ, M.L.; ACCHILE, M.; CHAGAS, E. C.; CHAVES, F. C. M.; MARTINS, M. L. Essential oils of *Lippia sidoides* and *Mentha piperita* against monogenean parasites and their influence on the hematology of Nile tilapia. **Aquaculture**, [s.l], v. 450, p. 182-186, 2016.

KOKETSU M.; GONÇALVES S.L. Óleos essenciais e sua extração por arraste em vapor. **Documentos, Embrapa-CTAA**, Rio de Janeiro, 1991.

KRYVTSOVA, M; UZHGOROD, V. U.; FEDKIV, O.; HRYTSYNA, M.R.; SALAMON, I. Anty-microbial, and anty-biofilm-forming properties of *Origanum vulgare* L. essential oils on *Staphylococcus aureus* and its antioxidant action. **Biologicni studii**, [s.l], v. 14, p. 27–38, 2020.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, [s.l], p. 349–382, 1987.

LIMA, R.K., M.G. CARDOSO, J.C. MORAES, S.M. CARVALHO, V.G. RODRIGUES & L.G.L. GUIMARÃES. Chemical composition and fumigant effect of essential oil of *Lippia sidoides* Cham. and monoterpenes against *Tenebrio molitor* (L.) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Ciência e Agrotecnologia**, [s.l], v. 35, p. 664-671. 2011.

LIMA, V. L. A. G.; MELO, E. A.; GUERRA, N. B. Correlação entre o teor de antocianinas e caracterização cromática de polpas de diferentes genótipos de aceroleira. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 10, n. 1, p. 51-55, 2007

MAGUEROSKI, A.; ASSOLINI, J. P. Extrato de *Allium schoenoprasum* L. inibe o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* in vitro. **Research, Society and Development**, [s.l], v. 12, n.2, 2023.

MAJOLO, C.; ROCHA, S. I. B. da; CHAGAS, E. C.; CHAVES, F. C. M.; BIZZO, H. R. Chemical composition of *Lippia* spp. essential oil and antimicrobial activity against *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture Research**. [s.l], v. 48, n. 5, p. 1-8, 2017.

MAJOLO, Cláudia et al. Atividade antibacteriana do óleo essencial e extratos de *Lippia sidoides* (Cham.) Verbenaceae e do timol frente à *Aeromonas hydrophila*. **Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)**, [s.l], v. 10, n. 2, p. 46-49, 2020.

MARTINS, E. R. et al. **Plantas Medicinais**. Edição Imprensa Universitária - UFV. Viçosa. Minas Gerais, p. 220, 1995.

MEDEIROS, Isabel Cabral de. **Atividade antifúngica de óleos essenciais e produtos comerciais no controle da Mancha de alternaria em mamão**. 2020. 46 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) Universidade Federal Rural do Semi-árido, 2020.

MONTEIRO, Michele Vitória de Melo. **Avaliar a atividade antimicrobiana de óleos essenciais Citronela (*Cymbopogon winterianus*) e Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl) em**

**cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.** 2017. 46f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Universidade Federal de Sergipe, 2017.

NASCIMENTO, J. C.; BARBOSA, L. C. A.; PAULA, V. F.; DAVID, J. M.; FONTANA, R.; SILVA, L. A. M.; FRANÇA, R. S. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Ocimum canum* Sims. and *Ocimum selloi* Benth. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [s.l.], v. 83, n. 3, p. 787–799, 2011.

NASCIMENTO, J.C. BARBOSA, L.C.A.; PAULA, V.F.; DAVID, J.M.; FONTANA, R.; SILVA, L.A.M.; FRANÇA, R.S. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Ocimum canum* Sims and *Ocimum selloi* Benth. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 83, p. 787-799, 2011.

OLIVEIRA, A. M. C. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante in vitro e atividade antifúngica de pimentas do gênero *Capsicum* spp.** 2011. 82 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2011.

OLIVEIRA, M.M.M.; BRUGNERA, D.F.; CARDOSO, M.G.; GUIMARÃES, L.G.L.; PICCOLI, R.H. Rendimento, composição química e atividade antilisterial de óleos essenciais de espécies de *Cymbopogon*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, n. 1, p. 8-16, 2011.

PACKER, J.F.; LUZ, M. M. S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural, **Rev. Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Curitiba, PR, Brasil v. 17, n. 1, p. 102-107, 2007.

PAIVA, L.A.F. et al. Protective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin against acetic acid-induced colitis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 93, n. 1, p. 51-60, 2007.

PARENTE-ROCHA, J. A. et al. Antifungal Resistance, Metabolic Routes as Drug Targets, and New Antifungal Agents: An Overview about Endemic Dimorphic Fungi. **Mediators of Inflammation**, [s.l.], v. 1, p. 1–17, 2017.

PASCUAL, M. E.; K. SLOWING, E. CARRETERO, D. SÁNCHEZ MATA, A. VILLAR, J. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **J. Ethnopharmacol**, [s.l.], v. 76, n. 3, p. 201-14. 2001.

PEREIRA, A. A.; **Efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de bactérias e fungos.** 2006. 58 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras- UFLA, 2006.

PEREIRA, A. C. R. L., J. V. OLIVEIRA, M. G. C. GONDIM JUNIOR & C. A. G. CÂMARA. Atividade inseticida de óleos essenciais e fixos sobre *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) em grãos de caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. **Ciência e Agrotecnologia**, [s.l.], v. 32, p. 717-724. 2008.

PETER, K. V. **Handbook of herbs and spices**. 2. ed. Cambridge: Woodhead Publishing Limited; 2004.

PINHEIRO, L. G. **Potencial antimicrobiano do óleo essencial de *Lippia Sidoides* contra**

**bactérias gram-negativas multidroga resistente.** 2021. 59f. Dissertação (Mestre em Biotecnologia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2021.

PRADO, Roberta Bernardino Ramos do; SANTOS, Rogério Minini dos; BERNUCI, Karine Zanoli. CARACTERIZAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE. **In.:** XI EPCC – Encontro Internacional de Produção Científica, 2019.

RAHMAN, A; KANG, S. C. Inhibition of foodborn pathogens and spoiling bacteria by essential oil and extracts of *Erigeron ramosus* (Walt.) B. S. P. **Journal of Food Safety**, [s.l], v. 29, p. 176-89, 2009.

ROCHA, C; REYNOLDS, N. D. SIMONS, M. P. Resistencia Emergente a los antibióticos: una amenaza global y un problema crítico en el cuidado de la salud. **Revista Peru Med Exp Salud Publica**, [s.l], v. 32, n. 1, p. 139-145, 2015.

RODRIGUES, E. A.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; SCAPIM, C. A.; FIORI-TUTIDA, A. C. G.; Potencial da planta medicinal *Ocimum gratissimum* no controle de *Bipolaris sorokiniana* em sementes de trigo. **Acta Scientia Agronomic**, [s.l], v. 28, n. 2, p. 213-220, 2006.

RODRIGUES, M. A. V. et al. **Emulsões de quitosana/gelatina com óleos de andiroba e de pracaxi: avaliação da atividade antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus*.** Ciências Tecnológicas, Exatas e da Terra e seu Alto Grau de Aplicabilidade [recurso eletrônico]. Ponta Grossa, p. 370, 2020

RODRIGUES, T. L. M. **Desempenho fisiológico e perfil químico do óleo essencial de *Eryngium foetidum* L. cultivada com adubação diferenciada.** 2019. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2019.

SÁ, J.P.N.; NETO, O.L.S.; SANTOS, C.L.A.; GADELHA, H.S.; ALENCAR, M.C.B.; ROBERTO, S.B.A.; A utilização de óleos essenciais na indústria de alimentos. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental**, [s.l], v. 12, n. 2, p.01-06, 2018.

SALIMENA, F.R.G. Novos sinônimos e tipificações em *Lippia* sect. *Rhodolippia* (Verbenaceae). **Darwiniana**, [s.l], v. 2, p. 121-125, 2002.

SANTANA, C.B.; SOUZA, J.G.L.; CORACINI, M.D.A.; WALERIUS, A.H.; SOARES, V.D.; COSTA, W.F.; PINTO, F.G. S.; Chemical Composition of Essential Oil from *Myrcia oblongata* and Potencial Antimicrobial, Antioxidant and Acaricidal **Activity Against *Dermanyssus gallinae***, [s.l], v. 34, n. 4, p. 996-1009, 2018.

SANTOS, S.; FERREIRA, F. S.; ALVA, J. C. R.; FERNANDEZ, L. G.; Atividade antimicrobiana in vitro do extrato de *Abarema cochiliocarpos*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 17, n. 2, p. 215-219, 2007.

SCORZONI, L. et al. Searching new antifungals: The use of in vitro and in vivo methods for evaluation of natural compounds. **Journal of Microbiological Methods**, [s.l], v. 123, n. 1, p. 68– 78, 2016.

SIANI, A.C.; SAMPAIO, A.L.F.; SOUSA, M.C.; HENRIQUES, M.G.M.O.; RAMOS, M.

F.S.; Óleos essenciais. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, [s.l.], p. 38-42, 2013.

SILVA, A. C., IACUZIO, R., CÂNDIDO, T. J. S., RODRIGUES, M. X., & SILVA, N. C. C. Resistência antimicrobiana de *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isolados de carcaças de frangos: resistência a Antibióticos e óleos essenciais. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS)**, [s.l.], v. 8, n. 1, p. 95-103, 2018.

SILVA, B.; SONEHARA, I. **Metodologias de determinação de sensibilidade antimicrobiana aplicadas a extrato vegetal bruto (hidroalcoólico): comparação entre duas técnicas de difusão em ágar**. Jornada de Iniciação Científica e Mostra de Iniciação Tecnológica - ISSN 2526-4699, Brasil, 2018.

SILVA, C. J.; BARBOSA, L. C. A.; DEMUNER, A. J.; PINHEIRO, A. L.; DIAS, I.; ANDRADE, N. J. Chemical composition and antibacterial activities from the essential oils of myrtaceae species planted in Brazil. **Química Nova**, [s.l.], v. 33, p.104-108, 2010.

SILVA, G.C., D.P. GOMES & C.C. SANTOS. Sementes de Feijão Caupi (*Vigna unguiculata* L. (Walp), tratadas com extrato de folhas de nim (*Azadirachta indica* A. Juss.) avaliação da determinação e da incidência e fungos. **Scientia Agraria**, [s.l.], v. 12, p. 19-24, 2011.

SILVEIRA, Sheila Mello da et al. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Cymbopogon winterianus* (citronela), *Eucalyptus paniculata* (eucalipto) e *Lavandula angustifolia* (lavanda). **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, [s.l.], v. 71, n. 3, p. 462-470, 2012.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017.

SIMÕES, C.M.O.; SCBENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R.; **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Brasil, Editora UFSC, 6 ed., p. 233; 472-473, 2010.

SIQUEIRA-LIMA, P. S., SILVA, J. C., QUINTANS, J. S.S., ANTONIOLLI, A. R., SHANMUGAM, S., BARRETO, R. S. S., SANTOS, M. R. V., ALMEIDA, J. R. G. S., BONJARDIM, L. R., MENEZES, I. R.A., & QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Natural products assessed in animal models for orofacial pain –a systematic review. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, [s.l.], v. 27, n. 1, p. 124-134, 2017.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Princípios de Análise Instrumental**. 9 ed. São Paulo: Editora Cengage Learning, 2015, p. 88, 2015.

SOARES, A. M. S.; PENHA, T. A.; ARAUJO, S. A.; CRUZ, E. M. O.; BLANK, A. F.; COSTA- JUNIOR, L. M. Assessment of different *Lippia sidoides* genotypes regarding their acaricidal activity against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, [s.l.], v. 25, n. 4, p. 401-406, 2016.

SOARES, B. V.; TAVARES-DIAS, M. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. **Biota Amazônia**, Macapá, v. 3, n. 1, p. 109-123, 2013.

SOUZA, L. M.; FONSECA, F. S. A.; SILVA, J. C.L.; SILVA, A. M.; SILVA, J. R.; MARTINS, E. R. Essential oil composition in natural population of *Lippia organoides* (Verbenaceae) during dry and rainy seasons. **Revista Biologia Tropical**, [s.l], v. 67, n. 1, p. 278-285, 2019.

STASHENKO, E.E.; MARTÍNEZ, J.R.; RUÍZ, C.A.; ARIAS G.; DURÁN, C.; SALGAR, W.; CALA, M. *Lippia organoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. **J. Sep. Sciencia**, [s.l], v.33, n.1, p.93-103, 2010.

SUTILI, F. J.; VELASQUES, A.; PINHEIRO, C. G.; HEINZMANN, B. M.; GATLIN, D. M.3RD, BALDISSEROTTI, B. Evaluation of *Ocimum americanum* essential oil as an additive in red drum (*Sciaenops ocellatus*) diets. **Fish Shellfish Immunology**, [s.l], v. 56, p. 155-161, 2016.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 8a. ed. Porto Alegre, Brasil: ARTMED, 2002.

UCKER, Anna Paula Ferreira Batista Goldfeld. **Desenvolvimento de plantas e produção de óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus jowitt*) sob diferentes adubações**. 2013. 67 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Solo e Água) – Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.

VERAS, H. N. H.; RODRIGUES, F. F. G.; BOTELHO, M. A.; MENEZES, I. R. A.; COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M. Antimicrobial effect of *Lippia sidoides* and Thymol on *Enterococcus faecalis* biofilm of the Bacterium isolated from root canals. **The Scientific World Journal**, [s.l], v. 1, n. 2, p. 1-6, 2014.

WATERHOUSE, A. Folin-ciocalteau micro method for total phenol in wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, p.3-5. 2006.

WEI, L. S.; WEE, W. Cheminal composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon nardus* citronela essential oil against systemic bacteria of aquatic animals, Irania Journal of Microbiology, [s.l], v. 5, n. 2, p. 147-152, 2013.