

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
CAMPUS DOIS VIZINHOS**

LORENA CLARA CRUZ

**COMPOSTOS MAJORITÁRIOS PRESENTES EM ÓLEOS
ESSENCIAIS: CARACTERIZAÇÃO ANTIMICROBIANA,
TOXICOLÓGICA E ANTIOXIDANTE**

DISSERTAÇÃO

DOIS VIZINHOS

2021

LORENA CLARA CRUZ

**COMPOSTOS MAJORITÁRIOS PRESENTES EM ÓLEOS
ESSENCIAIS: CARACTERIZAÇÃO ANTIMICROBIANA,
TOXICOLÓGICA E ANTIOXIDANTE.**

MAJOR COMPOUNDS PRESENT IN ESSENTIAL OILS: ANTIMICROBIAL,
TOXICOLOGICAL AND ANTIOXIDANT CHARACTERIZATION

Dissertação apresentada como requisito para
obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia da Universidade Tecnológica
Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos.

Orientador: Prof. Dr. Cleverson Busso

Coorientadora: Profa. Dra. Nédia de Castilho
Ghisi

DOIS VIZINHOS

2021



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Esta licença permite download e compartilhamento do trabalho desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es), sem a possibilidade de alterá-lo ou utilizá-lo para fins comerciais. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



**Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus de Ponta Grossa**

Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**



LORENA CLARA CRUZ

**COMPOSTOS MAJORITÁRIOS PRESENTES EM ÓLEOS ESSENCIAIS:
CARACTERIZAÇÃO ANTIMICROBIANA, TOXICOLÓGICA E ANTIOXIDANTE**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestra Em Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).
Área de concentração: Biotecnologia.

Data de aprovação: 20 de Dezembro de 2021

Prof Cleverson Busso, - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof Natalia Ketrin Almeida De Oliveira Mocelin, Doutorado - Fiocruz -

Fundação Oswaldo Cruz Prof.a Nedia De Castilhos Ghisi, - Universidade

Tecnológica Federal do Paraná

Prof.a Paula Fernandes Montanher, - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 20/12/2021.

Dedico este trabalho a minha família,
especialmente minha mãe que sempre me
incentivou e apoiou.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me amparado com seu amor incondicional nos momentos de dificuldades, por ter guiado meus caminhos e por tantas oportunidades.

A minha família por terem sido meu suporte, em especial à minha mãe, que sempre confiou em mim, por ter sido uma fonte de inspiração à minha realização profissional e como ser humano.

A Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Toledo, aos docentes, coordenadores e funcionários que proporcionaram o melhor dos ambientes para que esse trabalho fosse realizado.

Ao meu orientador Dr. Cleverson Busso que esteve sempre presente nas orientações e que nunca mediu esforços para auxiliar na concretização do projeto.

A minha coorientadora Dra. Nédia de Castilho Ghisi por toda ajuda e suporte.

Ao meu companheiro pelo apoio, paciência, dedicação, por toda força e incentivo, e por estar comigo sempre.

Aos professores Mario Henrique de Barros (USP) pelo fornecimento das linhagens de leveduras; professora Patrícia de Souza Bonfim (UEM) pelo auxílio nos experimentos de citotoxicidade e o professor Antonio Pedro Brusamarello pelas análises estatísticas, meu muito obrigado!

Ao CNPq, pelo apoio financeiro instituído pela concessão da bolsa do mestrado.

Aos meus colegas de sala e de pesquisa que não mediram esforços para me ajudar quando mais necessitei, em especial Fábio, Gabrielle e Leticia que me acompanharam desde o início e foram fundamentais para a realização desse sonho.

A Secretaria do Curso, pela cooperação.

E a todos os que por algum motivo contribuíram para a realização desta pesquisa, minha eterna gratidão.

Algo que você deveria sempre manter, e esta
é a única obrigação, é ser feliz
(OSHO)

RESUMO

A cada ano diversos óleos essenciais e extratos de plantas são relatados na literatura por apresentarem atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante, antimutagênica e até mesmo anticarcinogênica, sendo esse potencial de ação atribuído principalmente aos seus compostos majoritários. Diante desse contexto, o presente trabalho objetivou avaliar os compostos majoritários carvacrol, cinamaldeído e alfa-felandreno quanto ao potencial efeito antimicrobiano, antioxidante *in vivo* e *in vitro*, citotóxico e o perfil de toxicidade em ensaios *in vivo*. A pesquisa foi realizada nos laboratórios de pesquisa da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Toledo e os compostos em avaliação foram obtidos pela Sigma-Aldrich Brasil. O efeito antimicrobiano foi avaliado através dos ensaios de Disco-difusão, microdiluição em caldo para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e *Spot test* para determinar a Concentração Bactericida e Fungicida Mínima (CBM/CFM) frente aos microrganismos de interesse clínico. Determinou-se o potencial antioxidante por meio do teste *in vivo* utilizando linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* e testes *in vitro* pelas técnicas de captura de radicais livres (DPPH e ABTS) e poder redutor via FRAP. A toxicidade dos compostos foi avaliada pelo teste de letalidade utilizando larvas de *Artemia salina* e a citotoxicidade avaliada utilizando linhagens de fibroblasto L929 e células Vero. O composto que apresentou melhor atividade antimicrobiana sobre as linhagens testadas foi o carvacrol, com valores entre 0,02 e 1,82 mg.mL⁻¹, seguido do cinamaldeído com valores entre 0,20 e 0,98 mg.mL⁻¹, já o composto alfa-felandreno não apresentou potencial antimicrobiano nas concentrações testadas. Todos os compostos apresentaram potencial antioxidante ao menos em um dos testes *in vitro*, sendo a melhor atividade antioxidante também apresentada pelo carvacrol, que se destacou nos três ensaios, principalmente pelo método ABTS, com valor de 8404,54 µmol ET/g de composto. Na avaliação da atividade antioxidante *in vivo* as concentrações entre 1 e 32 µg.mL⁻¹ não foram o suficiente para constatar potencial antioxidante dos compostos, sendo que concentrações acima dessa faixa se mostraram com efeito inibitório frente a linhagem utilizada. O teste de letalidade em *Artemias*, indicou que todos os compostos apresentaram 100% de letalidade, ou seja, nas concentrações testadas entre 0,06 e 1 mg.mL⁻¹ os compostos apresentaram efeito extremamente tóxico sobre os organismos. O teste de citotoxicidade demonstrou que os compostos carvacrol e cinamaldeído são citotóxicos frente as linhagens celulares utilizadas. De acordo com os resultados, os compostos carvacrol e cinamaldeído apresentaram excelente potencial antimicrobiano frente a nove microrganismos de interesse clínico, além de um ótimo potencial antioxidante, sendo que o mesmo não foi observado com o alfa-felandreno. O teste de letalidade e citotoxicidade trazem certa limitação na aplicação dos compostos como fitoterápicos ou em alimentos, devido a toxicidade que os mesmos apresentam.

Palavras-chave: carvacrol; cinamaldeído; alfa-felandreno; microrganismos; *Artemia salina*; *Saccharomyces cerevisiae*.

ABSTRACT

Each year, several essential oils and plant extracts are reported in the literature for presenting antimicrobial, anti-inflammatory, antioxidant, antimutagenic and even anticarcinogenic activities, and this action potential is mainly attributed to their major compounds. In this context, the present work aimed to evaluate the major compounds carvacrol, cinnamaldehyde and alpha-phellandrene regarding their potential antimicrobial, antioxidant *in vivo* and *in vitro*, cytotoxic effects and the toxicity profile in *in vivo* assays. The research was carried out in the research laboratories of the Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo campus and the compounds under evaluation were obtained by Sigma-Aldrich Brazil. The antimicrobial effect was evaluated through the Disco-diffusion tests, microdilution in broth to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Spot test to determine the Minimum Bactericidal and Fungicidal Concentration (CBM/CFM) against microorganisms of clinical interest. The antioxidant potential was determined through the *in vivo* test using mutant strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *in vitro* tests using free radical scavenging techniques (DPPH and ABTS) and reducing power via FRAP. The toxicity of the compounds was evaluated by the lethality test using brine shrimp larvae and the cytotoxicity evaluated using fibroblast L929 strains and Vero cells. The compound that showed the best antimicrobial activity on the strains tested was carvacrol, with values between 0.02 and 1.82 mg.mL⁻¹, followed by cinnamaldehyde with values between 0.20 and 0.98 mg.mL⁻¹, whereas the compound alpha-phellandrene did not show antimicrobial potential at the concentrations tested. All compounds showed antioxidant potential in at least one of the *in vitro* tests, with the best antioxidant activity also being presented by carvacrol, which stood out in the three tests, mainly by the ABTS method, with a value of 8404.54 μmol ET/g of compound. In the evaluation of *in vivo* antioxidant activity, concentrations between 1 and 32 μg.mL⁻¹ were not enough to verify the antioxidant potential of the compounds, and concentrations above this range showed an inhibitory effect against the strain used. The lethality test in *Artemias* indicated that all compounds showed 100% lethality, that is, in the tested concentrations between 0.06 and 1 mg.mL⁻¹, the compounds showed an extremely toxic effect on the organisms. The cytotoxicity test showed that the compounds carvacrol and cinnamaldehyde are cytotoxic against the cell lines used. According to the results, the compounds carvacrol and cinnamaldehyde showed excellent antimicrobial potential against nine microorganisms of clinical interest, in addition to a great antioxidant potential, which was not observed with alpha-phellandrene. The lethality and cytotoxicity test bring some limitation in the application of compounds as herbal medicines or in foods, due to their toxicity.

Keywords: carvacrol; cinnamaldehyde; alpha-phellandrene; microorganisms. *Artemia salina*. *Saccharomyces cerevisiae*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura molecular do monoterpene Alfa-felandreno	17
Figura 2 - Estrutura molecular do carvacrol	19
Figura 3 - Ligação da molécula carvacrol com ergosterol como possível mecanismo de ação fungicida	23
Figura 4 - Estrutura molecular do Cinamaldeído	26
Figura 5 - Modelo da placa de petri para Disco-difusão contendo discos e formação de halo de inibição no entorno dos discos	32
Figura 6 - Atividade antimicrobiana dos compostos por meio da medição dos halos de inibição (região entre a borda do disco e o crescimento microbiano)	33
Figura 7 - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), através do método de microdiluição, do composto Cinamaldeído frente as bactérias <i>Salmonella enteritidis</i> e <i>Bacillus cereus</i> em triplicata	34
Figura 8 - Modelo da placa de petri para a metodologia <i>spot test</i>	36
Figura 9 - Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM), através do método Spot test, do composto Cinamaldeído frente as bactérias <i>Salmonella enteritidis</i> (três primeiras fileiras) e <i>Bacillus cereus</i> (três últimas fileiras) em triplicata	36
Figura 10 – Náuplio de <i>Artemia salina</i>	40
Figura 11 – Curva cinética de redução do radical livre DPPH dos compostos majoritários	48
Figura 12 - Viabilidade celular (%) de células Vero e fibroblasto L929 na presença de diferentes concentrações dos compostos majoritários carvacrol e cinamaldeído	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM), dos compostos alfa-felandreno, carvacrol e cinamaldeído frente a microrganismos de interesse clínico	42
Tabela 2 - Halos de inibição do crescimento (mm) do composto Carvacrol frente a microrganismos de interesse clínico.....	45
Tabela 3 - Halos de inibição do crescimento (mm) do composto Cinamaldeído frente a microrganismos de interesse clínico.....	46
Tabela 4 - Halos de inibição do crescimento (mm) dos antimicrobianos comerciais frente a microrganismos de interesse clínico.....	47
Tabela 5 - Atividade antioxidante dos compostos alfa-felandreno, carvacrol e cinamaldeído segundo métodos de captura de radicais livres ABTS e Poder Antioxidante pela Redução Férrica (FRAP).	48

LISTA DE SIGLAS E ACRÔNIMOS

NCBI	National Center for Biotechnology Information
pH	Potencial Hidrogeniônico
DPPH	2,2, difenil-2-picrilhidrazil
ABTS	3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico
FRAP	Poder antioxidante redutor férrico
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ATP	Adenosina trifosfato
ATPase	Adenosina trifosfatase
DMSO	Dimetilsulfóxido

LISTA DE ABREVIATURAS

CIM	Concentração Inibitória Mínima
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CFM	Concentração Fungicida Mínima
g	Gramas
h	Horas
mL	Mililitro
L	Litro
mg	Miligrama
Kg	Quilograma
NK	<i>Natural Killer</i>
PI	Iodeto de propídio
µg	Micrograma
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
UV	Ultravioleta
sp	Espécie
nm	Nanômetro
UFC	Unidade formadora de colônias
MH	Mueller Hinton

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Objetivos.....	15
1.1.1 Geral.....	15
1.1.2 Específicos	15
2 DESENVOLVIMENTO.....	17
2.1 Revisão de literatura	17
2.1.1 Alfa-felandreno	17
2.1.1.1 Bioatividade.....	18
2.1.2 Carvacrol.....	19
2.1.2.1 Atividade antibacteriana	20
2.1.2.2 Atividade antifúngica.....	22
2.1.2.3 Atividade antioxidante e antimutagênica.....	24
2.1.3 Cinamaldeído	25
2.1.3.1 Atividade antibacteriana	26
2.1.3.2 Atividade antifúngica.....	27
2.1.3.3 Atividade antioxidante e antimutagênica.....	28
2.2 Materiais e Métodos	29
2.2.1 Obtenção dos Fitoconstituintes	29
2.2.2 Microorganismos utilizados nos experimentos.....	29
2.2.3 Testes de Susceptibilidade Antimicrobiana	30
2.2.3.1 Preparação do inóculo.....	30
2.2.3.2 Teste de disco-difusão	30
2.2.3.3 Teste de microdiluição.....	33
2.2.3.3.1 Teste de microdiluição em caldo para bactérias	33
2.2.3.3.2 Teste de microdiluição em caldo para leveduras.....	35
2.2.3.4 <i>Spot Test</i>	35
2.2.4 Avaliação da Atividade Antioxidante <i>in vivo</i> em Linhagens Mutantes de <i>S. cerevisiae</i>	36
2.2.4.1 Determinação da quantidade celular durante o tratamento.....	38
2.2.5 Determinação do Potencial Antioxidante <i>in vitro</i>	38
2.2.5.1 Atividade sequestrante do radical DPPH (2,2-Difenil-1-Picril-Hidrazil).....	38
2.2.5.2 Atividade antioxidante por ABTS ^{•+}	39
2.2.5.3 Determinação do Poder Antioxidante Redutor Férrico (FRAP).....	39
2.2.6 Investigação de Toxicidade dos Compostos por meio do Teste de Letalidade em <i>Artemina salina</i>	40
2.2.7 Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> dos compostos carvacrol e cinamaldeído.....	41
2.3 Resultados e Discussões.....	42
2.3.1 Atividade Antimicrobiana.....	42

2.3.2 Atividade Antioxidante <i>in vitro</i>	47
2.3.3 Atividade Antioxidante <i>in vivo</i>	50
2.3.4 Teste de Letalidade em <i>A. salina</i>	51
2.3.5 Potencial citotóxico dos compostos majoritários	53
3 CONCLUSÕES.....	56
REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais sempre foram utilizados pelo ser humano para diversos fins, principalmente alimentícios, terapêuticos e higiênicos. Os relatos da utilização desses produtos estão presentes em diversas culturas e civilizações (MEDEIROS, 2014).

Com o avanço da ciência, muitas atividades biológicas de espécies vegetais foram descobertas e comprovadas, aumentando o interesse e a demanda de produtos naturais em todo o mundo (MACHADO; JUNIOR, 2011).

Atrelado ao interesse por compostos bioativos está a necessidade de substituir diversos compostos sintéticos como os conservantes de alimentos e defensivos agrícolas por produtos naturais com as mesmas propriedades, uma vez que estudos apontam que eles vêm se mostrando prejudiciais à saúde (MEDEIROS, 2014).

Além disso, é preocupante o número crescente de microrganismos resistentes aos compostos farmacêuticos sintéticos atualmente disponíveis, bem como a toxicidade que alguns deles apresentam ao homem, aos animais e ao próprio meio ambiente.

No Brasil, alguns programas incentivam a população quanto ao uso de produtos naturais, eles têm como objetivo disseminar conhecimento a respeito do uso seguro e para de ampliar o acesso da população aos produtos terapêuticos, principalmente para a prevenção de doenças. Ademais, esse encorajamento auxilia na sustentabilidade ambiental e na preservação de conhecimentos culturais e dos povos tradicionais (MACHADO; JUNIOR, 2011).

Um dos produtos que ganham cada vez mais destaques são os óleos essenciais (OE), misturas complexas que resultam do metabolismo secundário das plantas e possuem vasta aplicação. No entanto, variações ambientais, genéticas e até mesmo diferentes métodos de extração causam uma enorme variabilidade quanto a composição química dos óleos essenciais. Hoje, os estudos em torno dessas misturas, buscam identificar compostos majoritários responsáveis pelas atividades biológicas, com alta potencialidade, biodisponibilidade e baixo perfil de toxicidade (SEVERINO, 2008).

A grande vantagem de utilizar os compostos majoritários como antimicrobianos, antioxidantes e outras finalidades, está no controle e estabilidade da concentração, na potencialidade e nos resultados replicáveis. No entanto, algumas propriedades dessas substâncias são desafiadoras, como a alta volatilidade, o perfil de toxicidade e seus possíveis mecanismos de ação.

O composto alfa-felandreno ($C_{10}H_{16}$) ou 2-metil-5-propanol-2-cicloexano-1,3-dieno é um monoterpene cíclico encontrado em diversas plantas cujo o potencial terapêutico foi

relatado na literatura científica, tais como *Schinus molle* L. (aroreira-salso), *Monodora myristica* (noz-moscada jamaicana), *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-vermelha), *Annona senegalensis* (maçã africana), entre outras (CHALCHAT et al., 1997; LIN et al., 2013; DA SILVA et al., 2016; NCBI, 2020).

Outro composto majoritário quem vem se mostrando extremamente relevante no uso medicinal e alimentício é o Carvacrol ($C_{10}H_{14}O$) ou 2-metil-5-(1-metiletil)-fenol, um monoterpene fenólico presente em diferentes plantas, principalmente dos gêneros *Origanum* e *Thymus* (AMIRI; AKBARI, 2018; NCBI, 2020).

Já o composto majoritário Cinamaldeído (C_9H_8O) ou (E)-3-phenylprop-2-enal, é um aldeído aromático e é o principal composto presente na casca das espécies do gênero *Cinnamomum* (90% do óleo essencial da canela é cinamaldeído), responsável pelo seu aroma e sabor, além de diversas atividades biológicas (WANG et al. 2016; NCBI, 2020).

Dessa forma, visto que cresce a necessidade de trabalhos que busquem elucidar o comportamento e as propriedades dos compostos majoritários presentes nos óleos essenciais. As evidências experimentais são essenciais para tornar sua inserção no mercado como uma alternativa saudável, segura e sustentável no controle de doenças e da qualidade alimentar.

1.1 Objetivos

1.1.1 Geral

Analisar a atividade antimicrobiana, antioxidante *in vitro* e *in vivo*, potencial de toxicidade e citotoxicidade dos compostos majoritários alfa-felandreno, carvacrol e cinamaldeído.

1.1.2 Específicos

- Avaliar qualitativamente a atividade antimicrobiana dos compostos alfa-felandreno, carvacrol e cinamaldeído utilizando-se a técnica de disco difusão.
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM), utilizando-se as técnicas de microdiluição em placa e *spot test*.
- Comparar o potencial de ação antimicrobiano dos compostos em bactérias gram-positivas e gram-negativas de interesse clínico.

- Determinar a atividade antioxidante *in vitro* dos compostos majoritários pelas técnicas de captura de radicais livres (DPPH e ABTS) e poder de redução do metal (FRAP).
- Determinar o perfil de atividade antioxidante *in vivo* dos compostos frente ao dano oxidativo induzido em linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*, perante a quantidade de células viáveis pós-tratamento.
- Avaliar a toxicidade da CIM dos compostos, através do teste de letalidade em náuplios nas fases II e III de *Artemia salina*.
- Determinar o potencial citotóxico dos compostos frente a linhagens celulares de fibroblasto L929 e células Vero.

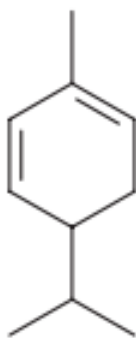
2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão de literatura

2.1.1 Alfa-felandreno

Alfa-felandreno ($C_{10}H_{16}$) ou 2-metil-5-propanol-2-cicloexano-1,3-dieno é um monoterpene cíclico (Figura 1) encontrado em diversas plantas tais como *Schinus molle* L. (aroreira-salso), *Monodora myristica* (noz-moscada jamaicana), *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-vermelha), *Annona senegalensis* (maçã africana), entre outras. Há diversos relatos na literatura científica do uso terapêutico desta substância. (CHALCHAT et al., 1997; LIN et al., 2013; DA SILVA et al., 2016; NCBI, 2020).

Figura 1 - Estrutura molecular do monoterpene Alfa-felandreno



Fonte: Lima et al. (2012)

O monoterpene alfa-felandreno é comumente utilizado em perfumarias e como aromatizante, sua fragrância se assemelha a pimenta preta e possui coloração levemente esverdeada (CATALDO; KEHEYAN; BACCARO, 2004; İŞCAN et al., 2012). Em temperatura ambiente se apresenta em forma de líquido, possui ponto de ebulição em 172°C e peso molecular $136,23\text{g/mol}$, solúvel em éter e insolúvel em água (NCBI, 2020).

Apesar de não haver muitos estudos a respeito das atividades biológicas desse composto individualmente, seu potencial efeito terapêutico está relacionado a sua presença majoritária na composição de alguns óleos essenciais (OE) (ZHANG et al., 2017).

2.1.1.1 Bioatividade

A maioria dos microrganismos constantemente sofrem mutações genéticas que pode ocasionar graus de resistência aos tratamentos por produtos comerciais disponíveis, neste sentido, muitas pesquisas atuais estão direcionadas na investigação de produtos naturais com atividade antimicrobiana com potencial terapêutico.

Os consumidores de OE no mundo crescem expressivamente, em razão de suas vastas propriedades terapêuticas, rentabilidade e principalmente pelo interesse em substituir substâncias sintéticas potencialmente tóxicas por compostos naturais, em que algumas já são conhecidas e consumidas pelo homem há muito tempo (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009).

As espécies *Monodora myristica*, *Monodora brevipes* e *Annona senegalensis* possuem o alfa-felandreno como composto majoritário em sua composição. As sementes e frutos dessas plantas mostraram efeito antimicrobiano contra cinco microrganismos de interesse clínico: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* (CHALCHAT et al., 1997). O potencial efeito antimicrobiano da espécie *M. myristica* também foi observado por Adewole et al. (2013), que propôs uma relação entre seu efeito medicinal com a presença de compostos majoritários.

Zhang et al. (2017) demonstraram que o alfa-felandreno apresenta alta atividade antifúngica contra a espécie *Penicillium cyclopium*, com crescimento micelial completamente inibido nas concentrações de >1,35 mL/L. Seu mecanismo de ação foi associado ao comprometimento da membrana celular, através da redução do pH, resultando em uma alta permeabilidade à membrana e perda do material citoplasmático.

Diversas propriedades terapêuticas foram atribuídas às espécies *Schinus molle L.* e *S. terebinthifolius* Raddi (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ; PRADO, 2005; JOHANN et al., 2008; MACHADO et al., 2007). Em suas composições foram encontradas altas concentrações de alfa-felandreno, as atividades antioxidantes e antitumorais de ambas as espécies se mostraram promissoras para novas estratégias no tratamento do câncer segundo Bendaoud et al. (2010).

O mesmo potencial antioxidante foi observado por Da Silva Dannenberg et al. (2016) para a espécie *S. terebinthifolius* Raddi. O OE de frutos maduros agiu contra a formação de compostos oxidativos primários em queijo minas frescal e na captura do radical livre DPPH (2,2, difenil-2-picrilhidrazil).

Em estudos com linhagens BALB/c de ratos, o alfa-felandreno promoveu uma resposta imune efetiva nas concentrações de 1, 5 e 25 mg/Kg. O composto estimula respostas imunes elevando a proliferação celular de linfócitos T e B, monócitos e macrófagos e conseqüentemente estimula a atividade de células NK (*natural killer cell*) e a fagocitose (LIN et al., 2013). Esse resultado sugere que as respostas anti-inflamatória e antimicrobiana relacionadas a este composto, são atribuídas na melhora da capacidade de resposta imune.

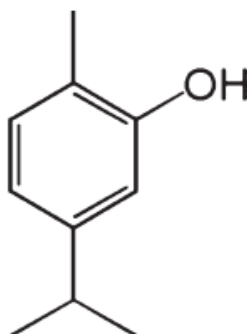
Hsieh et al. (2014) identificou pela primeira vez a ação do composto alfa-felandreno em células do câncer de fígado, induzindo a morte das células tumorais por necrose, semelhantemente ao que ocorre com o medicamento anticâncer cloroacetaldéido. Essa descoberta permite associar o efeito anticâncer dos OE de *Schinus molle* L. e *S. terebinthifolius* Raddi à presença majoritária do composto alfa-felandreno e que esse mecanismo de ação pode estar relacionado as suas propriedades antioxidantes (BENDAOU et al. 2010; İŞCAN et al., 2012).

Muitas propriedades terapêuticas, tais como, atividade anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidantes e antitumorais, estão relacionadas ao alfa-felandreno incentivando seu uso terapêutico. No entanto a escassez de trabalhos a seu respeito, aponta para a necessidade de mais estudos a respeito de sua toxicidade e potencial mutagênico.

2.1.2 Carvacrol

Carvacrol (C₁₀H₁₄O) ou 2-metil-5-(1-metiletil)-fenol é um monoterpreno fenólico (Figura 2) presente em diferentes plantas, principalmente dos gêneros *Origanum* e *Thymus* (AMIRI; AKBARI, 2018; NCBI, 2020).

Figura 2 - Estrutura molecular do carvacrol



Fonte: Can Baser, K. H. (2008)

Em temperatura ambiente se apresenta na forma de um líquido incolor, insolúvel em água e altamente solúvel em etanol e éter (KIRIMER; BASER; TUMEN, 1995). Possui ponto de fusão em 1°C e de ebulição em 237°C, sua massa molecular é de 150,217 g/mol (NCBI, 2020).

Estudos buscam compreender as propriedades desse composto e seu potencial antimicrobiano, antioxidante e anticarcinogênico (AIT-OUAZZOU, et al. 2013; ARUNASREE, 2010).

2.1.2.1 Atividade antibacteriana

O carvacrol é referido como um composto majoritário em diversas espécies sendo que a atividade biológica já é relatada na literatura (MUÑOZ-ACEVEDO; MARTÍNEZ; STASHENKO, 2009).

De Lima et al. (2017) avaliaram a ação antimicrobiana de timol e carvacrol frente a sete cepas de *E. coli* produtoras de β -lactamases de amplo espectro. Empregando a metodologia de microdiluição em placa para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), observaram que ambos fitoconstituintes tiveram ação bactericida frente às cepas avaliadas, com destaque para o carvacrol que apresentou atividade antimicrobiana em menores concentrações.

Em um estudo de Magi, Marini e Facinelli (2015), a atividade antimicrobiana de OE e carvacrol foram testadas frente a cepas de *Streptococcus pyogenes* resistentes ao antibiótico eritromicina. Os OE testados foram de *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris*, *Lavandula angustifolia*, *Mentha piperita* e *Melaleuca alternifolia*. Utilizando da metodologia de microdiluição em placas, os pesquisadores constataram que dentre os constituintes, o carvacrol obteve melhor resultado, expressando a menor CIM. Além disso, o carvacrol associado a eritromicina demonstrou atividade sinérgica às cepas resistentes. Ademais, também não foi possível selecionar mutantes carvacrol-resistente, demonstrando que o composto não é propenso ao desenvolvimento de resistência a esses microrganismos.

Para compreender a ação antibacteriana do carvacrol, Cristani et al. (2007) comparou a interação do timol, carvacrol, p-cimeno e γ -terpineno em biomembranas das bactérias *E. coli* e *S. aureus*. Os resultados demonstraram que todos os compostos foram capazes de inibir o crescimento bacteriano em baixas concentrações. O modo de ação dos fitoconstituintes foi avaliado através do marcador fluorescente carboxifluoresceína em vesículas unilamelares grandes com diferentes composições lipídicas. Foi constatado que o efeito antimicrobiano está

relacionado com a perturbação da fração lipídica da membrana plasmática dos microrganismos, podendo a substância também penetrar no interior da célula e interagir com locais críticos para atividade antibacteriana.

Trabalhos como De Souza et al. (2015) também atribuem a atividade antibacteriana do carvacrol à sua capacidade de inibir a viabilidade celular, testando os efeitos desse composto em células de *Aeromonas hydrophila*, onde foi demonstrado que o carvacrol promove graves danos a membrana e a estrutura da célula bacteriana. O tratamento com carvacrol causou alterações morfológicas, como encolhimento, torção celular, descolamento da membrana externa, ruptura de membrana plasmática, condensação do citoplasma e perda de material citoplasmático.

É possível observar que o carvacrol interfere tanto na membrana externa quanto na membrana interna das bactérias, sendo seu principal mecanismo de ação a alteração na permeabilidade da membrana. Com isso, o composto pode desintegrar a membrana externa devido a saída dos lipopolissacarídeos, atingir a membrana citoplasmática com consequente saída de Trifosfato de Adenosina (ATP), desativação da ATPase e a diminuição da força motriz dos prótons em alguns casos (ULTEE; KETS; SMID, 1999; LAMBERT et al., 2001; BURT et al., 2007).

Essa ação antimicrobiana é similarmente observada em diferentes fitoconstituintes que apresentam compostos fenólicos e frequentemente correlacionada com a hidrofobicidade dos compostos (TSAO; ZHOU, 2000; LAMBERT et al. 2001). Além disso, Ultee, Bennink e Moezelaar (2002), observaram que a presença do grupo hidroxila na molécula do carvacrol associado com um sistema de elétrons deslocalizados, são responsáveis por grande parte do seu efeito antimicrobiano. Eles ainda propõem que a molécula atua como um transportador transmembranar de cátions monovalentes, trocando seu próton por outro íon da membrana.

A importância da estrutura molecular do carvacrol foi mais bem observada no estudo de Ben-Arfa et al. (2006) que corroborou a hipótese levantada por Ultee, Bennink e Moezelaar (2002). Assim, comparado os efeitos antimicrobianos do carvacrol com mais cinco compostos com estruturas químicas diferentes, observou-se que a presença do grupo hidroxila e a hidrofobicidade apropriada do carvacrol são de fato importantes características que promovem um maior potencial antimicrobiano.

2.1.2.2 Atividade antifúngica

A contaminação alimentar por espécies fúngicas é um problema mundial, acarretando, sobretudo, diminuição da qualidade e o valor nutricional dos alimentos. A consequência disso é a expressiva perda pelo produtor, bem como contaminações por micotoxinas tornando-se um problema de segurança alimentar (EMBRAPA, 2015; LIMA, 2017).

Além da contaminação alimentar direta ocasionada por fungos, o excessivo uso de antimicrobianos sintéticos para o controle de crescimento microbiano é apontado como responsável pelo número crescente de microrganismos fitopatológicos e deteriorantes resistentes (BRUL; COOTE, 1999; BANERJEE; SAKAR, 2004). Surge ainda, o problema de que esses produtos sintéticos usados nos diversos campos do controle de fitopatógenos, podem se tornar um problema de segurança toxicológica (GOMES; FRINHANI, 2017).

Partindo para uma perspectiva terapêutica, infecções fúngicas no homem são uma ameaça crescente e o tratamento muitas vezes está abaixo do ideal. As limitações dos antifúngicos, a resistência dos fungos ao número pequeno de classes de drogas existentes e o perfil de toxicidade dos medicamentos, sobressalta a importância de desenvolver produtos naturais que permitam uma terapia sistêmica segura (DENNING; HOPE, 2010; LIMA et al., 2013).

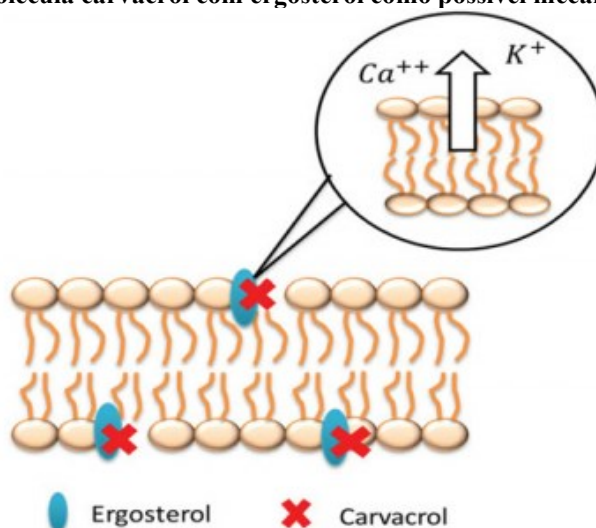
Diante desta dificuldade, Dalleau et al. (2008) investigou a ação de dez terpenos frente a biofilmes de *Candida albicans*. Nesse estudo, todos os terpenos foram eficazes na redução do biofilme, sobretudo o carvacrol, geraniol e timol que inibiram mais de 80% do desenvolvimento dessa estrutura. Os resultados desses terpenos se mostraram melhores que a ação do fluconazol, utilizado como controle do estudo, evidenciando a necessidade da inclusão de agentes naturais no tratamento de infecções fúngicas com fenômenos de resistência.

Ahmad et al., (2011) testaram os efeitos do carvacrol e timol frente a isolados sensíveis e resistentes de *Candida* sp. como: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. glabrata*. Os testes de microtitulação, *Time-kill* e disco-difusão, demonstraram que os compostos em estudo obtiveram melhores resultados na atividade antifúngica quando comparada ao fluconazol, usado como tratamento convencional para candidíase. Os resultados mostram que os compostos são eficientes em concentrações baixas (CIM entre 75 a 150 mg/L) e que possuem atividade antifúngica, ao passo que o fluconazol apresentou atividade fungistática frente aos isolados, resultado evidenciado pelo disco-difusão. Além

disso, o teste hemolítico em eritrócitos humanos demonstrou que os compostos são significativamente menos citotóxicos que os antifúngicos convencionais.

A atividade antifúngica do carvacrol também foi avaliada no estudo de Nóbrega et al. (2016), em isolados de *Cryptococcus neoformans*, uma levedura encapsulada causadora da criptococose. O composto apresentou CIM de 25 a 102 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ mostrando atividade antifúngica significativa contra os isolados. Ademais, o estudo sugeriu que o carvacrol pode se ligar ao ergosterol (componente da membrana celular dos fungos) e ao colesterol (esterol presente em células de mamíferos), interferindo na estrutura dessas moléculas (Figura 3). Essa ligação pode causar a desestabilização da membrana celular com consequente aumento da permeabilidade, causando a saída de Ca^{2+} e íons K^+ , além de radicais e proteínas, o que sugere que este composto pode se tornar tóxico para as células humanas em determinadas concentrações.

Figura 3 - Ligação da molécula carvacrol com ergosterol como possível mecanismo de ação fungicida



Fonte: Nóbrega *et al.* (2016)

A afinidade ao ergosterol como alvo específico também é sugerida por Ahmad et al., (2011). Neste estudo observaram que os isolados fúngicos clínicos e resistentes apresentaram uma diminuição de até 100% do nível de ergosterol celular total após exposição com 100 mg/L de carvacrol, enquanto que no controle com fluconazol a redução em isolados resistentes foi de apenas 29%. Da mesma forma, observações utilizando-se uma sonda fluorescente capaz de penetrar em células bacterianas apenas com lesões severas na membrana, demonstraram que proximamente 100% das células tratadas com carvacrol foram marcadas pela sonda.

Semelhantemente ao que ocorre nas células bacterianas, o carvacrol atua perturbando na estrutura da membrana celular do fungo, se ligando as suas estruturas, como o ergosterol, alterando sua permeabilidade e conseqüentemente acarretando na morte do fungo (DI PASQUA et al., 2006; LIMA et al., 2013; CHAVAN; TUPE, 2014).

2.1.2.3 Atividade antioxidante e antimutagênica

A produção excessiva de compostos oxidantes durante os processos metabólicos e o desequilíbrio dos sistemas de defesa antioxidante culmina para o estresse oxidativo celular. Esta alteração da regulação homeostática aumenta os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (exemplos: $O_2\cdot^-$, OH^- , 1O_2 , H_2O_2 , $NO\cdot$ e $NO_2\cdot^-$) responsáveis por causar danos oxidativos em células e tecidos (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

O estresse oxidativo está relacionado com o surgimento de doenças cardiovasculares e neurológicas, processos inflamatórios, diabetes, envelhecimento e diversos tipos de câncer. Os processos oxidativos, além de serem controlados por um sistema antioxidante fisiológico são equilibrados por fatores exógenos, principalmente a alimentação (VALKO et al., 2006; SILVA; JASIULIONIS, 2014). Dessa forma, a ingestão de frutas e vegetais ricos nos antioxidantes vitaminas A, C ou E além da prática de exercícios físicos, são essenciais para evitar que ocorram danos oxidativos em proteínas, lipídeos, carboidratos e ácidos nucléicos (BARBOSA et al., 2010).

Algumas pesquisas demonstraram que além do estresse oxidativo, muitas substâncias sintéticas usadas como antioxidantes para preservar o alimento, podem ser tóxicos às células animais e aumentar o desenvolvimento espontâneo de células cancerígenas (LINDENSCHMIDT et al., 1986; HOCMAN, 1988)

Assim, cresce a cada dia, o interesse e a busca por produtos naturais que possuam um alto poder antioxidante para serem usados de forma terapêutica. Muitos OE e seus compostos majoritários chamaram atenção por demonstrarem atividades redox significativas, podendo se tornar importantes moduladores desse desequilíbrio oxidativo (GUIMARÃES et al., 2010; SILVA; JASIULIONIS, 2014).

O carvacrol, além de possuir alta atividade antimicrobiana, também se destacou por apresentar propriedades antioxidantes, antimutagênica e anticarcinogênica (AYDIN; BAŞARAN; BAŞARAN, 2005; AYDIN; TÜRKEZ; KELEŞ, 2014). Acredita-se que esse mecanismo antioxidante está relacionado com a capacidade do grupo hidroxila sequestrar

radicais livres, interrompendo a ação em cadeia, ou inibir na etapa inicial a formação de radicais livres (SOARES, 2002; OXIDATIVO, 2002)

Nos estudos de Mastelic *et al.* (2008) foi observado que o carvacrol e seus derivados, apresentaram atividades antimicrobianas e antioxidantes significativas, além disso, observou-se atividade antiproliferativa em células de carcinoma humano. As substâncias se mostraram mais tóxicas às células malignas em relação as saudáveis, tal resultado ressalta a motivação de testar os compostos naturais e seus derivados para seu potencial uso preventivo ou coadjuvante no tratamento de doenças relacionadas ao estresse oxidativo.

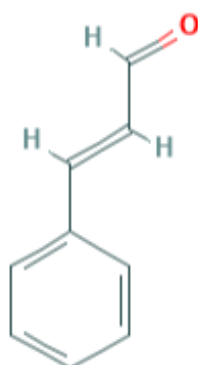
Estudos apontam que o carvacrol é responsável por reduzir danos oxidativos no DNA de linfócitos humanos (AYDIN; BAŞARAN; BAŞARAN, 2005) e preservar o fígado e células testiculares de ratos contra efeitos prejudiciais do peróxido de hidrogênio (SLAMENOVA *et al.*, 2008). De Carvalho (2020) também aponta diversas pesquisas com resultados promissores na ação anti-inflamatória e antioxidante do carvacrol em lesões pulmonares e distúrbios respiratórios.

O efeito antimutagênico do carvacrol pode estar relacionado com seu potencial efeito antioxidante, visto que o composto diminui o estresse oxidativo e conseqüentemente os danos no DNA e mutações somáticas (GONCHAROVA; KUZHIR, 1989; MEZZOUG *et al.*, 2007). Contudo, apesar dos seus efeitos promissores, é importante que mais pesquisas investiguem seu perfil toxicológico, para que seu uso terapêutico se torne seguro.

2.1.3 Cinamaldeído

O Cinamaldeído (C₉H₈O) ou (E)-3-phenylprop-2-enal é um aldeído aromático (Figura 4) e é o principal composto presente na casca das espécies do gênero *Cinnamomum* (90% do óleo essencial da canela é cinamaldeído), responsável pelo seu aroma e sabor (WANG *et al.* 2016; NCBI, 2020).

Este composto em temperatura ambiente se apresenta como um líquido oleoso de coloração amarela, pouco solúvel em água e miscível em álcool e éter. Sua massa molecular é de 132,15 g/mol, possui ponto de fusão em -7°C e de ebulição em 253°C (HARBISON; BOURGEOIS; JOHNSON, 2015; NCBI, 2020).

Figura 4 - Estrutura molecular do Cinamaldeído

Fonte: NCBI (2020)

2.1.3.1 Atividade antibacteriana

Por muitos séculos a canela é utilizada como tempero, sendo uma das especiarias mais empregadas na culinária, estendendo-se o seu uso também para fins medicinais. Partes da planta são usadas no tratamento e prevenção de várias doenças, principalmente as gastrointestinais (HUANG et al., 2008; GRUENWALD, FREDER; ARMBRUESTER, 2010).

Muitas das atividades biológicas da canela foram atribuídas ao cinamaldeído, uma vez que esta substância encontra-se como constituinte majoritário na composição da canela e demonstra um grande potencial antimicrobiano, anti-inflamatório e antioxidante (DIDRY; DUBREUIL; PINKAS, 1994; ANDRADE et al., 2012; WANG et al., 2016).

Cinamaldeído apresentou atividade antimicrobiana, com inibição forte, contra treze microrganismos: *Aeromonas hydrophila* (DMST 2798), *Bacillus cereus* (DMST 5040), *E. coli* (DMST 4212), *E. coli* O157: H7 (DMST 12743), *Listeria monocytogenes* (DMST 17303), *Micrococcus luteus* (DMST 15503), *Pseudomonas aeruginosa* (DMST 4739), *Salmonella* Enteritidis (DMST 15676), *S. aureus* (DMST 8840), *Enterococcus faecalis* (TISTR 379), *Saccharomyces cerevisiae* (TISTR 5240), *Zygosaccharomyces rouxii* (TISTR 5044) e *C. albicans* (TISTR 5779) (SANLA-EAD et al., 2012).

Nos estudos de Ali et al. (2005) utilizando método de diluição em ágar, o cinamaldeído apresentou atividade antimicrobiana contra cepas bacterianas patogênicas, sendo 29 cepas de *Helicobacter pylori* isoladas de úlceras gástricas, uma cepa de *H. pylori* (ATCC26695) e uma cepa de *E. coli* (NCIM2089) como controle bacteriano. Todas as cepas foram inibidas em uma concentração de 2 µg.mL⁻¹, inclusive as que se mostraram

resistentes ao tratamento de antibióticos. Além disso, cepas resistentes a antibióticos não desenvolveram resistência ao composto, mesmo após dez repiques em concentrações sub-inibitórias. Os resultados indicam que o composto poderia ser útil em condições médicas específicas.

Devido sua alta volatilidade e baixa solubilidade em água, esse composto se torna limitado para determinadas aplicações. No entanto, pesquisas utilizando cinamaldeído encapsulado se mostram promissoras contra bactérias patogênicas, exibindo efeito inibidor por até nove horas para cepa de *E. coli* (TIAN et al., 2016).

Alguns estudos buscam avaliar o efeito sinérgico entre diferentes compostos em busca de resultados mais eficazes. A interação entre cinamaldeído e carvacrol se mostrou potencializada quando comparada a atividade antimicrobiana de maneira individual. Ye et al. (2013) observou a ocorrência desse efeito em sete bactérias de onze analisadas. Quando testados em conjunto, o carvacrol reduziu a CIM do cinamaldeído e o inverso também foi observado. Ambos os compostos não demonstraram resultados citotóxicos significativos.

O mecanismo de ação desse composto depende da concentração e do estágio do patógeno em crescimento. Utilizando-se como base o perfil metabólico de *E. coli*, foi observado alterações da membrana e incorporação de proteínas em concentrações baixas de cinamaldeído. Já em concentrações altas, o composto penetra na célula danificando enzimas citoplasmáticas e o transcrito levando a bactéria à morte (MOUSAVI, et al. 2016). Os resultados corroboram com outros estudos, que avaliaram os danos a membrana como principal mecanismo de ação (ZHANG, et al., 2016).

2.1.3.2 Atividade antifúngica

A ação fungicida de espécies do gênero *Cinnamomum* e seu potencial efeito inibitório contra a produção de micotoxinas, é reconhecido em diversas pesquisas, sendo essa atividade antimicrobiana relacionada à presença de altas concentrações de cinamaldeído. As concentrações de cinamaldeído são essenciais para promover uma ação fungistática ou fungicida. (BULLERMAN; LIENU; SERIER, 1977; FERHOUT, et al., 1999; HAMEED; ALTAMEME; MOHAMMED, 2016).

Taguchi et al. (2013) observaram que na concentração de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ o composto promoveu ação fungistática em células de *C. albicans*, inibindo o crescimento micelial, mas não a viabilidade celular. Em uma concentração de 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foi possível observar que as células perderam sua viabilidade e que houve graves danos na membrana.

Shreaz et al. (2011), avaliaram o efeito antifúngico de cinamaldeído em dezoito isolados de *Candida* sp. resistentes ao fluconazol, seu efeito fungicida foi associado à sua capacidade de se ligar em alvos localizados na membrana celular. Os autores propõem que seu mecanismo de ação está centralizado na redução do teor de ergosterol na membrana, semelhantemente a ação do carvacrol.

O mecanismo de ação preciso do cinamaldeído ainda não está claro, no entanto, sabe-se que esse composto causa danos e permeia a membrana acessando diversos sítios intracelulares, destruindo o conteúdo citoplasmático e outras estruturas membranosas de células fúngicas (SHREAZ, et al., 2013; KHAN; AHMAD; CAMEOTRA, 2013).

A inibição de proteínas presentes na parede celular fúngica também é um possível mecanismo de ação de acordo com o que foi observado em estudos. Sua estrutura molecular e seus componentes igualmente podem estar envolvidos, principalmente a função aldeído, que mostrou atribuir mais força na atividade antimicrobiana promovida pelo cinamaldeído (WANG; CHEN; CHANG, 2005; SHREAZ et al., 2011).

2.1.3.3 Atividade antioxidante e antimutagênica

As investigações a respeito das propriedades terapêuticas do cinamaldeído constitui um importante avanço para indústrias alimentícias e medicinais. Além de ser um excelente antimicrobiano, suas propriedades antioxidantes e anticâncer se apresentaram promissoras tanto para prolongar a vida útil de alimentos, quanto para impedir danos celulares em células animais respectivamente (SINGH et al., 2007; UCHI et al., 2017).

Muitos fatores externos podem favorecer o estresse oxidativo, um exemplo é a poluição ambiental que com o passar do tempo interage com células específicas da pele gerando uma série de distúrbios por intoxicação (ESSER; RANNUG; STOCKINGER, 2009).

O mecanismo de ação antioxidante do cinamaldeído contra estresse oxidativo em células dendríticas pode ocorrer por duas atividades biológicas conhecidas: através da inibição de receptores aril hidrocarboneto (AhR), responsável pela participação na resposta imune e pela sinalização de NRF2/HO1, responsável pela transcrição de defesas antioxidantes, ou seja, esse composto auxilia no equilíbrio da resposta anti-inflamatória, impedindo que ocorram danos na resposta imune e a estimulação do estresse oxidativo (STOCKINGER et al., 2011; UCHI et al., 2017).

Pesquisadores apontam que esse composto é responsável pelo aumento das atividades de defesa antioxidante, como observado pela redução da oxidação de lipídeos,

proteínas e redução de espécies reativas de oxigênio (EROs). Além disso, o composto pode atuar como um sequestrador de radicais livres de oxigênio e lipídeos (FARAG; ALAGAWANY; TUFARELLI, 2017).

Estudos realizados em células HL-60 da leucemia promielocítica humana, registraram que o cinamaldeído apresentou atividade anticâncer atuando como um indutor de apoptose nas células cancerígenas devido a uma perturbação mitocondrial e produção de EROs (KA et al., 2003).

Os efeitos antimutagênicos do cinamaldeído foram observados em diversos estudos utilizando células bacterianas e de mamíferos (OHTA et al., 1983; DE SILVA; SHANKEL, 1987; OHTA, 1993). Embora não há um estudo que demonstre o mecanismo de ação antimutagênico, estudos propõe que o cinamaldeído em concentrações não tóxicas, podem aprimorar o sistema de reparo recombinacional atuando na atividade da enzima *recA* e inibir mutações causadas por agentes químicos (SHAUGHNESSY; SETZER; DEMARINI, 2001; KING, et al., 2007)

É necessário que mais estudos sejam feitos a respeito dos mecanismos de atuação desse composto para elucidar possíveis efeitos citotóxicos ou mutagênicos, a fim de elucidar seus mecanismos de ação e promover seu uso seguro para fins terapêuticos e alimentícios.

2.2 Materiais e Métodos

Os experimentos foram conduzidos nos Laboratórios de Microbiologia, Biologia Molecular e Central analítica da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), campus Toledo.

2.2.1 Obtenção dos Fitoconstituintes

Os fitoconstituintes alfa-felandreno teor $\geq 75\%$ (CAS: 99-83-2), carvacrol teor $\geq 98\%$ (CAS: 499-75-2) e cinamaldeído teor $\geq 95\%$ (CAS: 104-55-2) foram obtidos pela Sigma-Aldrich® Brasil com atestado do grau de pureza dos produtos.

2.2.2 Microorganismos utilizados nos experimentos

As cepas bacterianas *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Bacillus cereus* (ATCC10876) e *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076) foram

fornecidas pelo banco de germoplasma do Núcleo Experimental de Micologia Aplicada (NEMA), as leveduras *Candida albicans* (INCQS 40006), *Candida krusei* (INCQS 40147), *Candida parapsilosis* (INCQS 40038) e *Candida glabrata* (INCQS 40136) e a bactéria *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) foram fornecidas pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, Brasil.

2.2.3 Testes de Susceptibilidade Antimicrobiana

Para a determinação da capacidade antimicrobiana dos compostos majoritários, foram aplicadas metodologias quantitativas (microdiluição e *Spot test*) e qualitativas (disco-difusão), afim de estabelecer as concentrações necessárias para inibição e/ou morte dos microrganismos.

2.2.3.1 Preparação do inóculo

As bactérias foram cultivadas em placas de petri contendo meio ágar Mueller Hinton (MH) (KASVI[®]), a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24h. Após esse período, cinco colônias isoladas foram selecionadas e transferidas por alçada, para um tubo contendo 5 mL de caldo MH e cultivadas em agitador orbital tipo shaker com agitação a 100 rpm e temperatura de $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 12h (overnight). Uma alíquota foi retirada dessa cultura overnight e incorporada em 10 mL de caldo MH estéril, sendo incubada novamente em shaker com a 100 rpm e temperatura a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 6h. Após esse período iniciou-se o protocolo de Disco-difusão e Microdiluição em caldo.

Para os experimentos conduzidos com cepas do gênero *Candida*, o cultivo foi realizado em placas contendo meio ágar *Brain Heart Infusion* (BHI) (KASVI[®]), meio indicado para crescimento de leveduras patogênicas, e incubadas a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24h antes da realização do experimento. Após esse período o processo de crescimento em caldo ocorreu análogo ao realizado com as bactérias, com exceção do caldo utilizado, sendo neste caso o BHI.

2.2.3.2 Teste de disco-difusão

A realização do teste ocorreu conforme protocolo do *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI) seguindo as recomendações do documento M2-A12 Vol. 35, n. 1,

com algumas modificações, a fim de analisar os padrões de desempenho para testes de susceptibilidade a discos antimicrobianos.

Em suma, após o crescimento bacteriano, a densidade da cultura foi ajustada em caldo MH para bactérias e BHI para leveduras, padronizada conforme a solução-padrão da escala 0,5 de McFarland. Para tanto, a densidade bacteriana foi determinada em espectrofotômetro com comprimento de onda em 625 nm e absorvância entre 0,08 e 0,10 correspondente a uma suspensão contendo aproximadamente a $1-2 \times 10^8$ UFC/mL.

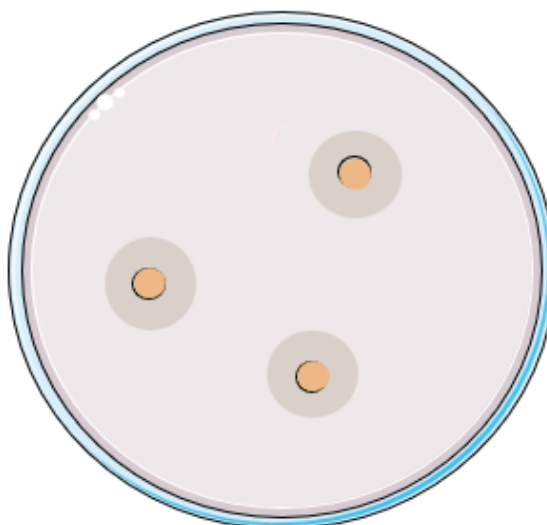
A densidade da cultura de levedura foi ajustada em solução-padrão da escala 0,5 de McFarland e verificada em espectrofotômetro com comprimento em 530 nm, e absorvância entre 0,08-0,10 correspondente a $1-5 \times 10^6$ UFC/mL.

Foram testadas cinco concentrações de cada composto sendo, 250, 166, 111, 74 e 49 mg.mL⁻¹, diluídas em solução aquosa de Tween 80[®] (propilenoglicol) marca DINÂMICA[®] a 2%.

Após a padronização da densidade dos inóculos e diluição dos compostos, um *swab* de algodão foi mergulhado nas culturas e o excesso de líquido removido pressionando contra a parede interna do tubo. Em seguida, foi realizado um esfregaço em toda superfície da placa contendo ágar MH (teste com bactérias) e em placa de ágar BHI (teste com leveduras). Sendo esse procedimento repetido quatro vezes, sempre girando a placa 60° a cada repetição, conforme orientações da norma em uso.

Posteriormente com auxílio de uma pinça estéril, as placas receberam 3 discos de papel filtro de 6 mm de diâmetro cada contendo 10 µL dos compostos, sendo cada placa a triplicata das concentrações dos compostos. Cada disco foi pressionado suavemente contra a superfície do meio de cultura para total contato e dispostos a uma distância de 30 mm entre si, para evitar sobreposições de halos (Figura 5). Como controle positivo, foram utilizados discos dos antimicrobianos (SENSIDISC DME[®]) ampicilina (10 µg) e clotrimazol (50 µg) para as bactérias e leveduras respectivamente, além do controle negativo Tween 80[®] a 2%.

Figura 5 - Modelo da placa de petri para Disco-difusão contendo discos e formação de halo de inibição no entorno dos discos.



Fonte: Compilação do autor (2021)¹

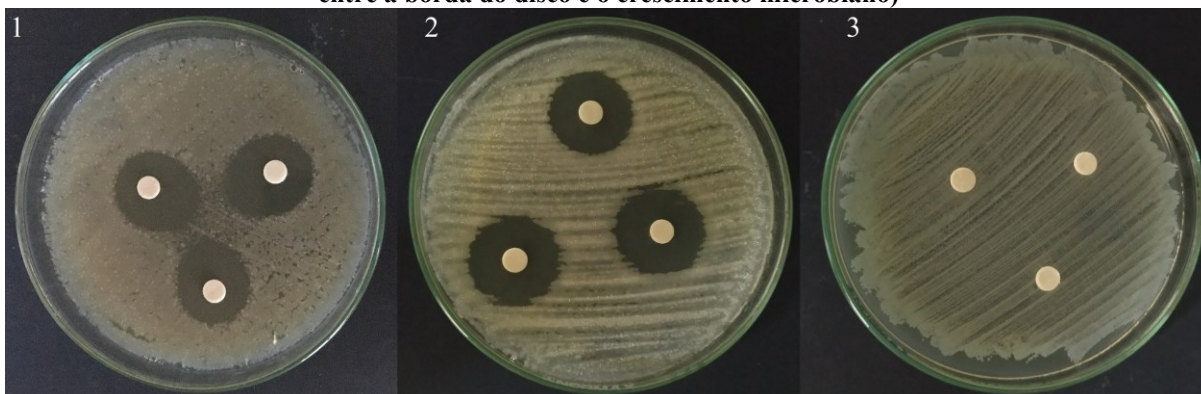
As placas foram incubadas em estufa a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 18-24h, em seguida os halos foram aferidos em milímetros com auxílio de um paquímetro e os microrganismos classificados como sensíveis, intermediários ou resistentes aos compostos (Figura 6).

Como critério de avaliação da sensibilidade dos microrganismos frente aos compostos, foi adotado os padrões de sensibilidade descritos por Ponce, et al. (2003). Os autores classificaram a sensibilidade aos diferentes OEs pelo diâmetro dos halos: não sensível (-) para diâmetro < 8 mm; sensível (+) para diâmetro de 9–14 mm; muito sensível (++) para diâmetro de 15-19 mm e extremamente sensível (+++) para diâmetro > 20 mm.

Os dados referentes ao teste de disco difusão foram submetidos a análise da variância (ANOVA) e quando significativo procedeu-se o teste de comparação múltipla de média de Tukey ($p \leq 0,05$), com o auxílio do programa RStudio (RSTUDIO TEAM, 2016), utilizando o pacote ExpDes.pt (FERREIRA; CAVALCANTI; NOGUEIRA; 2011).

¹ Montagem a partir de imagens coletas no site Smart Servier Medical Art via <https://smart.servier.com/>

Figura 6 - Atividade antimicrobiana dos compostos por meio da medição dos halos de inibição (região entre a borda do disco e o crescimento microbiano)



1: Atividade antifúngica do composto carvacrol na concentração de 166 mg.mL^{-1} frente a levedura *C. krusei*. 2: Atividade antifúngica do composto cinamaldeído na concentração de 111 mg.mL^{-1} frente a levedura *C. krusei*. 3: Resistência da bactéria *S. aureus* frente ao composto alfa-felandreno na concentração de 250 mg.mL^{-1} .

Fonte: A autoria própria (2021)

2.2.3.3 Teste de microdiluição

Para o teste de microdiluição em caldo, utilizou-se placas do tipo Elisa, em que foram realizados os pré-ensaios a fim de se obter as concentrações ideais dos compostos. Inicialmente a concentração dos compostos foi avaliada em porcentagem, assim, obteve-se que para os compostos carvacrol e cinamaldeído a concentração do primeiro poço seria de 6% e a concentração do alfa-felandreno seria de 25%.

Após esse processo de triagem e convertendo as porcentagens em massa, as concentrações testadas para cada composto no teste de microdiluição foram: alfa-felandreno $85 - 0,04 \text{ mg.mL}^{-1}$, carvacrol $58,5 - 0,02 \text{ mg.mL}^{-1}$ e cinamaldeído $63 - 0,03 \text{ mg.mL}^{-1}$.

2.2.3.3.1 *Teste de microdiluição em caldo para bactérias*

A realização do teste foi realizada conforme o CLSI seguindo as normas do protocolo M7-A6 vol. 23 No. 2, com a finalidade de determinar a sensibilidade das bactérias mediante a CIM.

Todo o processo de cultivo e crescimento dos microrganismos ocorreram semelhantemente ao teste de disco difusão, incluindo o ajuste da densidade do inóculo bacteriano conforme escala 0,5 de McFarland.

Posterior ao tempo de crescimento e ajuste da densidade, foi realizada uma diluição em meio caldo MH de 1:100 para se obter uma concentração de aproximadamente 5×10^4

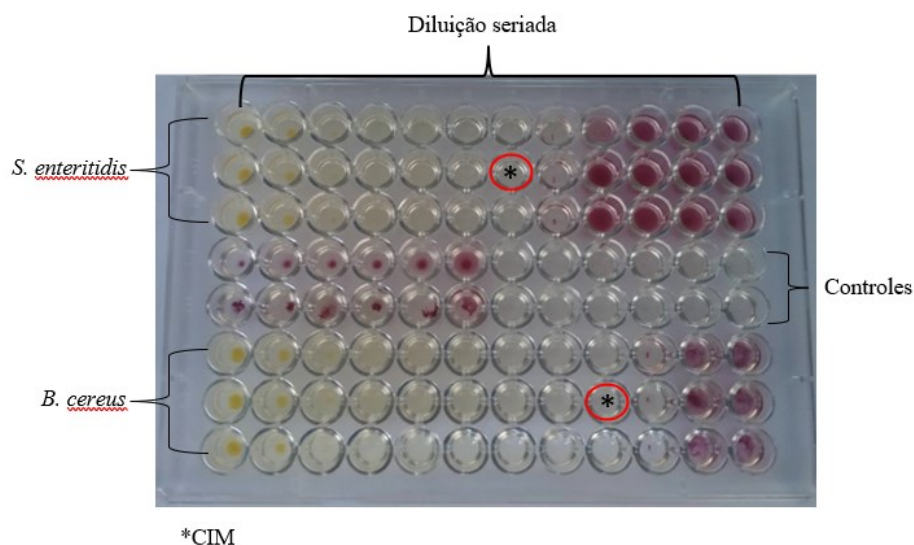
UFC/poço segundo recomendações do CLSI. Os compostos alfa-felandreno, carvacrol e cinamaldeído foram diluídos em caldo MH e emulsificados em Tween 80® a 2%.

Em uma placa de Elisa, foi adicionado 100 µL de caldo MH em todos os 96 poços, em seguida adicionou-se 100 µL do composto nos seis primeiros poços da coluna um. Após a homogeneização, transferiu-se 100 µL de cada poço da coluna um para a coluna dois e assim sucessivamente em uma diluição seriada, descartando 100 µL do último poço. Por fim, com as soluções diluídas, adicionou-se uma alíquota de 20 µL da suspensão do inóculo preparado em cada um dos 96 poços.

Duas fileiras da microplaca foram reservadas para os controles negativos, sendo um teste contendo caldo MH + Tween 80® a 2%, um com o caldo e os microrganismos avaliados, e um apenas com meio de cultura a fim de certificar a esterilidade do meio (Figura 7). Para efeitos comparativos (controle positivo) realizou-se um teste similar ao descrito anteriormente na presença de diferentes concentrações do antibiótico penicilina. O teste foi realizado em triplicata para todos os controles, compostos e bactérias analisadas.

As placas foram incubadas a $35\pm 2^\circ\text{C}$ durante 16 a 20h para o crescimento, decorrido o tempo de crescimento, acrescentou-se um volume de 20 µL do corante-revelador em cada poço, seguida novamente da incubação das microplacas por mais duas horas para posterior leitura dos resultados.

Figura 7 - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), através do método de microdiluição, do composto Cinamaldeído frente as bactérias *Salmonella enteritidis* e *Bacillus cereus* em triplicata.



As linhas D e F correspondem aos controles, onde do poço 1 ao 6 foi adicionado apenas meio de cultura e bactéria, e do poço 7 ao 12 apenas meio de cultura

Fonte: Autoria própria (2021)

2.2.3.3.2 *Teste de microdiluição em caldo para leveduras*

A realização do teste ocorreu conforme normas do CLSI M27-A2 vol. 22 N°. 15, com a finalidade de determinar a sensibilidade das leveduras mediante a CIM.

Todo o processo de cultivo e crescimento dos microrganismos ocorreram semelhantemente ao teste de disco difusão, incluindo o ajuste da densidade do inóculo leveduriforme conforme escala de 0,5 McFarland.

Posterior ao tempo de crescimento e ajuste da densidade, foi realizada uma diluição em meio caldo BHI de 1:100 para se obter uma concentração de aproximadamente $5,0 \times 10^2$ a $2,5 \times 10^3$ células/mL. Os compostos alfa-felandreno, carvacrol e cinamaldeído foram diluídos em caldo BHI e emulsificados em Tween[®] 80 a 2%.

A metodologia aplicada a placa de Elisa ocorreu igualmente ao realizado para as bactérias, com exceção do meio de cultura, que neste caso utilizou-se o caldo BHI, do volume de inóculo adicionado em cada poço de 100 µL e do controle positivo utilizando o antifúngico comercial clotrimazol.

Por fim, as placas foram incubadas a 37° durante 24h para crescimento, em seguida aplicou-se o corante revelador para posterior leitura dos resultados. O teste foi realizado em triplicata para todos os compostos, controles e leveduras analisadas.

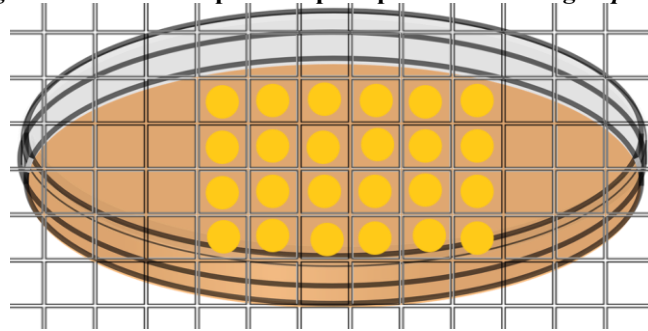
2.2.3.4 *Spot Test*

Após o período de crescimento dos microrganismos nos testes de microdiluição, antecipadamente à aplicação do corante, a CIM foi determinada observando a presença ou ausência de crescimento visível, caracterizado por turbidez do meio e presença de “*buttons*” (sedimentos) no fundo do poço.

A partir dessa análise, foi coletado 5 µL dos três poços anteriores a CIM, do poço contendo a CIM e de dois poços posteriores a CIM, para cada fileira da placa de Elisa. Sendo esse volume inoculado em placa com meio ágar MH (bactérias) e ágar BHI (leveduras) com uma distância de 1 cm², seguindo orientações de um papel milimetrado (Figura 8).

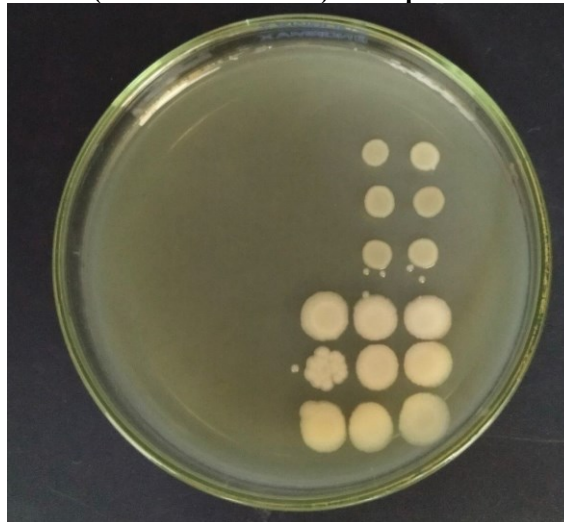
Por fim, após a absorção da umidade, as placas foram incubadas a 37°C por 24h para posterior análise. A leitura dos resultados resumiu-se em observar o desenvolvimento dos microrganismos nas concentrações selecionadas e comparar com os resultados do teste de microdiluição posterior ao uso do corante (figura 9). Este método permite determinar a Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Fungicida Mínima (CFM).

Figura 8 - Modelo da placa de petri para a metodologia *spot test*.



Fonte: Autoria própria (2020).

Figura 9 - Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM), através do método *Spot test*, do composto Cinamaldeído frente as bactérias *Salmonella enteritidis* (três primeiras fileiras) e *Bacillus cereus* (três últimas fileiras) em triplicata.



Fonte: Autoria própria (2021)

2.2.4 Avaliação da Atividade Antioxidante *in vivo* em Linhagens Mutantes de *S. cerevisiae*

Os ensaios antioxidantes *in vivo* são considerados ideais quando comparados aos testes *in vitro*, devido a gama de informações valiosas acerca dos mecanismos de ação, complexidade e interação celular e até mesmo capacidades tóxicas, trazendo assim, mais segurança na aplicação dos produtos com destinação ao consumo humano (MENG et al., 2017).

A levedura *S. cerevisiae* é considerada um modelo celular de diversos estudos, essa capacidade é atribuída devido a sua semelhança com células eucarióticas superiores, conhecimento amplo do genoma e por ser de fácil cultivo. Além disso, dentro do contexto de estresse oxidativo, esse microrganismo possui sistemas endógenos naturais de defesa

antioxidantes que são interessantes correlacionando-os com sistemas de eucariotos superiores (STINCO et al., 2015; GUARIENTI; BERTOLIN; COSTA, 2010).

Para os testes de atividade antioxidante *in vivo* foi utilizado a linhagem de *S. cerevisiae* GTT1 (*MATa, his3, leu2, met15, ura3, gtt1*). Esta linhagem foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Biogênese Mitocondrial da Universidade de São Paulo e apresenta deleção do gene responsável pela produção da proteína Glutathione S-transferase (GST), caracterizada por sua ação detoxificante, capaz de combater radicais livres xenobióticos e intracelulares.

A linhagem GTT1 foi cultivada em placa YPD (1% extrato de levedura, 2% de glicose, 2% de peptona e 2% de ágar bacteriológico) por 72h, em seguida foram selecionadas 3 colônias frescas e transferidas para caldo YPG, condicionando o crescimento celular *overnight* em shaker a 28°C, sob agitação de 150 rpm.

Após o crescimento celular realizou-se a padronização da quantidade celular através da absorbância de 0,6 em espectrofotômetro com comprimento de onda a 600 nm. Com base na absorbância, o volume celular foi convertido para uma concentração final de 1×10^7 UFC/mL.

A concentração dos compostos para análise de toxicidade foi baseada nos valores obtidos pelos testes antioxidantes *in vitro* e em uma série de ensaios de sensibilidade que a levedura poderia apresentar na presença dos compostos, uma vez que a atividade antimicrobiana dos mesmos poderia interferir nos resultados. Assim, as concentrações de 1 até 32 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, seguindo uma razão de dois em cada concentração, foram analisadas no experimento. Como controle positivo foi utilizado o agente estressor menadione nas concentrações de 0,2 e 2 mM.

Os tratamentos foram realizados em duas etapas, a primeira etapa corresponde ao pré-tratamento e adaptação das células frente a menor concentração do agente estressor, 0,2mM, juntamente com a concentração do composto, que são mantidos a 28°C em uma rotação de 150 rpm durante uma hora.

Já a segunda etapa ocorre incubando as células com 2 mM do agente estressor menadione conjuntamente com uma nova dosagem do composto, sendo as células mantidas nas mesmas condições que o pré-tratamento por mais uma hora.

2.2.4.1 Determinação da quantidade celular durante o tratamento

Após o período de incubação da primeira etapa de tratamento, e logo após adicionar o menadione da segunda etapa, uma alíquota foi retirada de três tratamentos para realizar a medição de absorvância, correspondente ao tempo zero. Então esse segundo tratamento foi incubado por mais uma hora como descrito do tópico anterior e em seguida, durante 8h alíquotas foram coletadas em intervalos específicos para medição da absorvância, a fim de determinar a concentração celular presente no meio.

Uma curva de quantidade celular x tempo foi gerada para verificar o efeito dos compostos na presença da quantidade de células presentes no meio.

2.2.5 Determinação do Potencial Antioxidante *in vitro*

A atividade antioxidantes dos compostos carvacrol, cinamaldeído e alfa-felandreno, foi determinada pelos métodos de captura dos radicais livres DPPH e ABTS, como também pelo método de redução do ferro (FRAP).

2.2.5.1 Atividade sequestrante do radical DPPH (2,2-Difenil-1-Picril-Hidrazil)

A atividade de sequestro do radical livre DPPH foi avaliada conforme a metodologia descrita pela EMBRAPA (2007).

Inicialmente os compostos foram diluídos em metanol e uma alíquota de 0,1 mL de cada amostra foi acrescida em 3,9 mL de solução de DPPH a 0,06 mM, em um tubo Falcon de 15 mL. A mistura foi homogeneizada e as leituras (515 nm) foram estimadas até a diminuição e estabilização do DPPH. O metanol foi utilizado como branco para calibrar o espectrofotômetro.

Após as leituras o resultado da atividade antioxidante (AA) foi expresso em porcentagem de inibição do DPPH de acordo com a equação (1):

$$AA(\%) = \frac{(Ab - Aa) \times 100}{Ab} \quad (1)$$

Em que: Ab = Absorvância do branco, Aa = absorvância da amostra.

2.2.5.2 Atividade antioxidante por ABTS^{•+}

A metodologia da capacidade de eliminação de ABTS^{•+} foi determinada de acordo com o método descrito por Re, Roberta et al. (1999) com adaptações.

Para tal, uma solução do composto 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico ABTS^{•+} (7 mM) com persulfato de potássio (2,45 mM) foi incubada à temperatura ambiente por 16h na ausência de luz. Após o tempo de preparo da solução, a mesma foi diluída em uma solução tampão de fosfato de sódio a 5 mmol L⁻¹ até absorvância de 0,700 ± 0,02 em comprimento de onda de 734 nm. Em seguida, 20 µL de cada amostra diluída foi acrescida a 2 mL da solução ABTS^{•+} e após a homogeneização a mistura foi incubada em temperatura ambiente e ao abrigo de luz por 6min.

A absorvância foi lida em 734 nm e o resultado calculado de acordo com a curva analítica do antioxidante Trolox expresso em µmol de equivalente Trolox por grama de composto (µmol T/g composto), determinado a partir a curva analítica preparada com soluções de referência cujas concentrações foram de 250 – 2500 µmol L⁻¹. A equação da reta utilizada ($y = -8,9217x + 0,639$) apresentou correlação linear, com $R^2 = 0,9953$.

2.2.5.3 Determinação do Poder Antioxidante Redutor Férrico (FRAP)

A metodologia da atividade antioxidante por meio da redução do ferro ocorreu de acordo com Benzie e Strain (1996). Este ensaio consiste na habilidade das amostras em reduzir o complexo $[\text{Fe(III)(TPTZ)}_2]^{3+}$ a $[\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{3+}$ de cor azul e absorvância de 593 nm.

O reagente FRAP foi preparado através de uma mistura de 25 mL de tampão acetato de sódio 300 mmol L⁻¹ (pH 3,6), 2,5 mL de 2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina (TPTZ) a 10 mmol L⁻¹ e 2,5 mL de solução de FeCl₃ a 20 mmol L⁻¹ seguindo a proporção 10:1:1 (v/v/v).

Em seguida, um volume de 10 µL de cada amostra diluída foi acrescida a 3 mL de reagente FRAP. Essa mistura foi incubada a 37°C por um período de 40 min. ao abrigo de luz, seguida pela leitura da absorvância à um comprimento de onda de 593 nm, utilizando-se 3 mL da solução de reagente FRAP como o branco.

O resultado foi calculado e expresso em µmol de equivalente Trolox por grama de composto (µmol T/g composto), determinado a partir a curva analítica preparada com soluções de referência cujas concentrações foram de 150 – 500 µmol L⁻¹. Por regressão linear

a equação da reta utilizada ($y = 45,425x - 0,0764$) apresentou correlação linear, com $R^2 = 0,9933$.

2.2.6 Investigação de Toxicidade dos Compostos por meio do Teste de Letalidade em *Artemia salina*.

O ensaio de letalidade ocorreu de acordo com o proposto por Meyer *et al.* (1982) com algumas modificações.

Os ovos de *A. salina* foram obtidos em loja de aquarofilia e colocados em um recipiente com água mineral acrescida de sal marinho não iodado, na proporção de 25 g de sal para 1000 mL de água. O recipiente se manteve a uma temperatura de 25°C sobre aeração e luminosidade constante por 48h.

Após esse período as Artemias em estágio larval (náuplios) (Figura 10) foram retiradas e separadas em um recipiente com água, dez exemplares foram selecionados e transferidos para um tubo de ensaio, cada tubo corresponde a uma réplica e cada tratamento foram realizadas com três réplicas. Cada experimento foi realizado mantendo-se um grupo controle negativo contendo o emulsificante Tewen[®] 80 (2%).

Figura 10 – Náuplio de *Artemia salina*



Fonte: Shutterstock²

Foram testadas cinco concentrações na faixa de 0,062 a 1 mg.mL⁻¹ em uma razão de 2, para os três compostos, com um controle negativo de 1 µg.mL⁻¹. Cada composto em sua

² Shutterstock. Movement larvae, nauplios Artemia salina. Disponível em: <https://www.shutterstock.com/es/video/clip-1023170383-movement-larvae-nauplios-artemia-salina>. Acesso em: 28 dez. 2021.

respectiva concentração foi adicionado aos tubos contendo os dez exemplares de larvas até o volume final de 5 mL.

A contagem das larvas sobreviventes ocorreu após 24h em contato com os compostos, foram consideradas mortas, as larvas que permanecerem imóveis por 10 segundos após a agitação suave dos tubos.

2.2.7 Avaliação da citotoxicidade *in vitro* dos compostos carvacrol e cinamaldeído

A avaliação citotóxica foi realizada no Laboratório de Micologia Médica da Universidade Estadual de Maringá, UEM, sob a coordenação da professora Patrícia de Souza Bonfim. O teste foi realizado utilizando células Vero (células de rim de macaco verde) e fibroblasto L929 humano pelo ensaio *Cell Titer* 96 (Promega, Madison, WI, USA) baseado na redução de MTS (3-[4,5-dimetil-2-il]-5-[3-carboxymethoxyphenyl]-2-[4-sulfophenyl]-2H-tetrazólio).

As células foram cultivadas em DMEM (*Eagle's Modified Dulbecco's Medium*) a 37°C em 5% de CO₂ e 95% de ar para formação da monocamada celular, em seguida as células foram tripsinizadas com uma solução de tripsina a 25% (Gibco), ajustadas a concentração de 2x10⁵ células/mL e incubadas em placas de 96 poços por 24h.

Então os poços foram lavados com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e expostos a diferentes concentrações dos compostos, sendo cinamaldeído de 3,94 a 0,25 mg.mL⁻¹ e carvacrol de 3,66 a 0,23 mg.mL⁻¹, em DMEM por mais 24h. O composto alfa-felandreno não foi utilizado para o teste uma vez que o mesmo não apresentou atividade antimicrobiana e de insignificante ação antioxidante. Todos os experimentos foram feitos em triplicata, inclusive o controle com Tween[®] 80 nas concentrações de emulsificação dos compostos.

A citotoxicidade dos compostos foi avaliada como a média de três experimentos independentes. A porcentagem de viabilidade celular (%CV) foi calculada usando a seguinte equação: %CV = (A amostra / A branco) × 100, em que o branco é o meio com células e MTS, o branco também foi utilizado como controle nos experimentos, sendo apresentado como 100% da viabilidade celular. A concentração citotóxica 50% (CC 50) foi definida como a concentração do composto (mg.mL⁻¹) requerida para redução de 50% da viabilidade das células.

2.3 Resultados e Discussões

2.3.1 Atividade Antimicrobiana

Os compostos carvacrol e cinamaldeído apresentaram atividade inibitória em todos os microrganismos avaliados, enquanto que alfa-felandreno não apresentou potencial antimicrobiano na concentração máxima avaliada. Os valores estimados de CIM pelo método de microdiluição em caldo e os valores de CBM e CFM avaliados pela técnica de *Spot test*, para cada composto bem como dos controles positivos, estão representados na Tabela 1.

Tabela 1 - Valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM), dos compostos alfa-felandreno, carvacrol e cinamaldeído frente a microrganismos de interesse clínico

		Compostos majoritário/antimicrobianos (mg.mL ⁻¹)						
		Alfa-felandreno	Carvacrol	Cinamaldeído	Ampicilina	Clotrimazol		
BACTÉRIAS	<i>E. coli</i>	CIM	n.d.	0,91	0,49	0,01	-	
		CBM	n.d.	0,91	0,98	0,01	-	
	<i>S. aureus</i>	CIM	n.d.	0,11	0,24	< 0,01	-	
		CBM	n.d.	0,22	0,49	< 0,01	-	
	<i>P. aeruginosa</i>	CIM	n.d.	0,91	0,98	> 0,05	-	
		CBM	n.d.	1,82	0,98	> 0,05	-	
	<i>B. cereus</i>	CIM	n.d.	0,22	0,24	> 0,05	-	
		CBM	n.d.	0,11	0,24	> 0,05	-	
	<i>S. enteritidis</i>	CIM	n.d.	0,11	0,49	0,05	-	
		CBM	n.d.	0,11	0,98	> 0,05	-	
	LEVEDURAS	<i>C. albicans</i>	CIM	n.d.	0,04	0,20	-	> 0,15
			CFM	n.d.	0,04	0,20	-	> 0,15
		<i>C. parapsilosis</i>	CIM	n.d.	0,04	0,20	-	> 0,15
			CFM	n.d.	0,19	0,20	-	> 0,15
<i>C. glabrata</i>		CIM	n.d.	0,09	0,20	-	> 0,15	
		CFM	n.d.	0,19	0,20	-	> 0,15	
<i>C. krusei</i>		CIM	n.d.	0,02	0,20	-	> 0,15	
		CFM	n.d.	0,02	0,20	-	> 0,15	

-: não aplicável. n.d.: não determinado.

Fonte: Autoria própria.

O carvacrol apresentou os melhores resultados frente a maioria dos microrganismos investigados, com concentrações de CIM variando entre 0,02 a 1,82 mg.mL⁻¹. Das cinco bactérias patogênicas, *S. enteritidis* e *S. aureus* foram as mais sensíveis ao carvacrol com CIM de 0,11 mg.mL⁻¹, seguido do cinamaldeído, com concentrações moderadamente maiores, mas ainda assim com forte potencial de inibição, sendo a menor CIM de 0,24 mg.mL⁻¹ para *S. aureus* e *B. cereus*.

O composto carvacrol apresentou efeito inibitório e bactericida nas mesmas concentrações para as bactérias *E. coli* e *S. enteritidis* (0,91 e 0,11 mg.mL⁻¹ respectivamente), enquanto para as outras bactérias a ação bactericida foi equivalente ao dobro da CIM. O composto cinamaldeído apresentou CBM na mesma concentração que CIM para as bactérias *P. aeruginosa* e *B. cereus*, para o restante a ação bactericida também foi o dobro da CIM.

Os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com as investigações conduzidas por Du *et al.* (2015). Neste trabalho prévio o composto carvacrol apresentou ação antimicrobiana para oito cepas bacterianas patogênicas, com valores de CIM entre 375 – 1500 µg.mL⁻¹, vale ressaltar que *S. enteritidis* obteve a menor CIM (187,5 µg.mL⁻¹) e *E. coli* 375 µg.mL⁻¹. Esses resultados, estão de acordo com os obtidos no presente estudo, uma vez que a bactéria *Salmonella* também apresenta uma sensibilidade maior que *E. coli* frente ao carvacrol.

Os efeitos antimicrobianos do carvacrol e cinamaldeído frente a bactérias patogênicas são encontrados em vários estudos (DAL POZZO, et al., 2011; LIMA, 2017; SANTURIO, et al., 2007; SOUZA; SILVA; PICCOLI, 2019). Albano, M. (2016), apresentou resultados relevantes referente ao cinamaldeído frente a *S. aureus*, *S. enteritidis*, *P. aeruginosa* e *E. coli*. Com concentrações variando entre 100 e 400 µg.mL⁻¹, os autores observaram que as bactérias gram-negativas (*E. coli* e *S. enteritidis*) foram mais sensíveis que as bactérias gram-positivas (*S. aureus* e *P. aeruginosa*).

Neste estudo, é interessante observar que as bactérias gram-positivas (*S. aureus* e *B. cereus*) apresentaram uma sensibilidade maior que as bactérias gram-negativas (*E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. enteritidis*), com exceção do composto carvacrol que também apresentou forte atividade antimicrobiana frente a *S. enteritidis*. Comumente, as bactérias gram-negativas tendem a ser mais resistentes a antimicrobianos devido a presença de duas membranas lipídicas (uma membrana interna e outra externa), o que possibilita o desenvolvimento de mecanismos enzimáticos em seu espaço periplasmático o que conseqüentemente resulta em resistência a alguns compostos antimicrobianos (ALBANO, 2016; PÍREZ; MOTA, 2006).

Os compostos ainda demonstraram um forte efeito antifúngico frente as ATCCs de *Candida* sp., com exceção do alfa-felandreno que novamente não apresentou atividade antimicrobiana nas concentrações avaliadas. O carvacrol desempenhou melhor efeito tanto inibitório quanto fungicida para todas as leveduras, principalmente para *C. krusei* e *C. albicans*, com mesma CIM e CFM, de 0,02 mg.mL⁻¹ e 0,04 mg.mL⁻¹ respectivamente. Já o cinamaldeído apresentou para todas as leveduras a mesma concentração inibitória e fungicida de 0,20 mg.mL⁻¹. Todas as cepas de *Candida* apresentaram resistência ao antifúngico comercial Clotrimazol na concentração máxima avaliada neste trabalho.

O efeito fungicida dos compostos avaliados é relatado por diversos autores, que ainda relacionam esse potencial a inibição do ergosterol da membrana celular e conseqüentemente ao colapso da célula fúngica (AHMAD, et al., 2011; LIMA, et al., 2013; FERHOUT, et al., 1999). Os mesmos autores, demonstram que os compostos possuem ação fungicida nas mesmas concentrações ou em concentrações próximas das concentrações inibitórias, assim como o presente trabalho.

As informações a respeito da atividade antimicrobiana do composto alfa-felandreno em sua forma pura são escassas na literatura, sua ação antimicrobiana muitas vezes se encontra associada ao sinergismo desse composto com os demais constituintes dos óleos essenciais (DE LIMA, et al., 2006). Faccin (2013) em seus estudos faz um comparativo entre extratos hidroalcoólicos e OE das folhas, frutos verdes e frutos maduros da espécie *S. terebinthifolius* Raddi, conhecida por conter o composto alfa-felandreno majoritariamente em sua composição. Segundo essa autora, foi encontrada a presença majoritária do alfa-felandreno apenas no OE dos frutos maduros, e que este apresentou valores antimicrobianos inferiores em comparação com as outras partes das plantas, além de não ter apresentado ação bactericida para bactérias gram-negativas e inibição de crescimento frente as bactérias gram-positivas.

Teixeira et al. (2020), também relatou que o OE de Pimenta Rosa (*S. terebinthifolius*), com presença majoritária de alfa-felandreno, apresentou baixa atividade antimicrobiana frente a sete isolados de *S. aureus*. Eryigit, et al. (2017), relata que o OE de *Schinus molle* L. com 31,74% de alfa-felandreno em sua composição, apresentou baixa atividade antimicrobiana frente ATCCs de *E. coli*, *S. typhimurium*, e *C. albicans*.

Diferentemente dos testes de microdiluição e *Spot test* que fornecem resultados quantitativos referente ao potencial antimicrobiano de compostos, o teste de disco-difusão deve ser considerado um teste qualitativo. Isso se deve a característica apolar que alguns óleos

e compostos majoritários contêm, como é o caso dos compostos em estudo, que dificulta a difusão no meio de cultura fornecendo dados quantitativos inexatos (ELOFF, 2019).

A Tabela 2 apresenta os valores dos halos referentes as zonas de inibição do composto carvacrol frente aos microrganismos avaliados. Apesar da maioria dos microrganismos apresentarem extrema sensibilidade ao composto na concentração de 250 mg.mL⁻¹, em concentrações inferiores o efeito inibitório se torna enfraquecido ou praticamente inexistente. Possivelmente isso se deve ao fato de sua baixa solubilidade afetar a difusão no meio e, conseqüentemente, no contato com as células microbianas.

Tabela 2 - Halos de inibição do crescimento (mm) do composto Carvacrol frente a microrganismos de interesse clínico.

Microrganismos	Tratamentos (mg.mL ⁻¹)				
	250	166	111	74	49
<i>C. albicans</i>	20,7(1,6) a	18,4(1,2) a	0,0(0,0) b	0,0(0,0) b	0,0(0,0) b
<i>C. glabrata</i>	15,6(0,3) a	10,4(0,2) b	0,0(0,0) c	0,0(0,0) c	0,0(0,0) c
<i>C. parapsilosis</i>	22,3(0,9) a	16,5(0,7) b	13,6(0,3) c	0,0(0,0) d	0,0(0,0) d
<i>C. krusei</i>	27,3(1,1) a	20,8(0,4) b	0,0(0,0) c	0,0(0,0) c	0,0(0,0) c
<i>B. cereus</i>	23,8(1,5) a	10,2(0,7) b	8,8(0,2) b	0,0(0,0) c	0,0(0,0) c
<i>S. aureus</i>	33,7(0,8) a	12,6(0,9) c	0,0(0,0) c	0,0(0,0) c	0,0(0,0) c
<i>E. coli</i>	27,2(2,9) a	22,3(2,5) a	8,9(1,0) b	8,0(0,3) bc	0,0(0,0) c
<i>S. enteritidis</i>	32,1(1,6) a	27,5(0,2) a	16,0(1,3) b	8,7(0,2) c	8,7(0,1) c
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	0	0	0

Médias seguidas por mesma letra na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Valores entre parênteses representam \pm o erro padrão da média.

Fonte: Autoria própria.

A bactéria *S. enteritidis* apesar de ter apresentado o segundo maior halo de inibição, foi a única que apresentou sensibilidade ao composto em todas as concentrações. O maior halo foi evidenciado na bactéria *S. aureus*, no entanto ocorre um declínio vigoroso na concentração de 166 mg.mL⁻¹ e ineficácia nas demais concentrações. Em contrapartida a bactéria *P. aeruginosa* não demonstrou sensibilidade nem mesmo na maior concentração, corroborando com os demais testes antimicrobianos ela se mostrou mais resistente ao composto quando comparado aos outros microrganismos, mas ainda assim o carvacrol teve um ótimo efeito bactericida mínimo, com 1,82 mg.mL⁻¹. Esse é mais um fato que apoia a teoria de que o teste de disco-difusão deve ser encarado como qualitativo devido as

interferências relacionadas ao comportamento molecular de alguns compostos sobre o meio de cultura, especialmente sua difusão (BONA, *et al.*, 2014)

As zonas de inibição no teste de disco-difusão observadas em cinco concentrações testadas do composto cinamaldeído estão representados na Tabela 3. Para todas as concentrações testadas observou-se atividade antimicrobiana contra os microrganismos empregados neste estudo. Segundo os padrões de sensibilidade descritos por Ponce, *et al.* (2003), as leveduras e bactérias se mostraram extremamente sensíveis ao cinamaldeído na concentração máxima de 250 mg.mL⁻¹ e permaneceram sensíveis até a concentração mínima de 49 mg.mL⁻¹, com exceção da bactéria *P. aeruginosa*, que se mostrou muito sensível na máxima concentração e não sensível na concentração mínima.

Tabela 3 - Halos de inibição do crescimento (mm) do composto Cinamaldeído frente a microrganismos de interesse clínico.

Microrganismos	Tratamentos (mg.mL ⁻¹)				
	250	166	111	74	49
<i>C. albicans</i>	28,3(1,1) a	25,2(0,4) b	22,5(0,4) c	16,6(0,7) d	15,6(0,2) d
<i>C. glabrata</i>	37,9(0,3) a	23,9(0,7) b	21,8(0,9) b	16,6(0,4) c	12,8(0,9) d
<i>C. parapsilosis</i>	29,1(1,2) a	28,9(1,1) a	16,8(0,7) b	15,3(0,2) b	11,6(0,2) c
<i>C. krusei</i>	28,2(0,1) a	24,5(1,0) b	21,7(0,3) c	20,8(0,2) c	11,1(0,4) d
<i>B. cereus</i>	34,3(0,4) a	30,5(2,2) ab	28,1(0,5) b	18,5(0,6) c	18,4(1,0) c
<i>S. aureus</i>	32,0(1,6) a	32,0(1,6) a	15,5(0,0) b	14,4(0,1) b	13,5(0,4) b
<i>E. coli</i>	22,7(1,2) a	21,8(0,6) a	17,2(0,6) b	14,2(0,3) bc	11,1(0,7) cd
<i>S. enteritidis</i>	32,6(0,6) a	25,8(0,9) b	19,4(0,1) c	16,3(0,3) cd	11,5(0,4) e
<i>P. aeruginosa</i>	17,8(2,7) a	11,4(0,7) b	9,6(0,5) b	9,6(0,1) b	8,3(0,1) b

Médias seguidas por mesma letra na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Valores entre parênteses representam \pm o erro padrão da média.

Fonte: Autoria própria.

Considerando o crescimento bacteriano, a cepa *P. aeruginosa* exibiu o menor halo de inibição, com 17,8 mm. Já a cepa de *B. cereus* foi a que apresentou a maior sensibilidade, evidenciado pelo halo de 34,3 mm. Esses resultados estão de acordo com os encontrados nos testes de microdiluição e *Spot test*. Quanto a avaliação antifúngica do composto, a levedura *C. glabrata* se destacou frente a todos os microrganismos testados, apresentando a maior sensibilidade na concentração máxima, com um halo de 37,9 mm. As demais leveduras também apresentaram valores clinicamente importantes quanto a inibição pelo cinamaldeído, uma vez que todas estas cepas testadas expressaram resistência sobre os antifúngicos

comerciais: fluconazol, clotrimazol e nistatina no teste de disco-difusão. A princípio, seria testado apenas o clotrimazol como controle, no entanto, as leveduras se mostram resistentes na concentração máxima de 150 mg.mL⁻¹, dessa forma, optamos por testar mais dois fármacos: fluconazol e nistatina em 150 mg.mL⁻¹, que se mostraram ineficazes frente as *Candidas*.

Esse perfil de resistência às drogas entre os microrganismos tem se tornado cada vez mais frequentes e críticos tornando-se um fardo à saúde humana, uma vez que a descoberta de novas drogas não acompanha o ritmo de adaptação e resistência (ESTRELA, 2018; ROCHA, 2019; ZARDO; MEZZARI, 2004). No presente estudo foi possível observar resistência de algumas bactérias ao antibiótico ampicilina, tais como: *B. cereus*, *P. aeruginosa* e *S. enteritidis*, e de todas as *Candida* sp. frente a três tipos de antifúngicos mais utilizados contra candidíase (Tabela 4). Além disso, todos os microrganismos permaneceram resistentes ao alfa-felandreno no teste de disco-difusão, até mesmo na maior concentração de 250 mg.mL⁻¹.

Tabela 4 - Halos de inibição do crescimento (mm) dos antimicrobianos comerciais frente a microrganismos de interesse clínico.

Microrganismos	Antimicrobianos			
	Ampicilina	Fluconazol	Nistatina	Clotrimazol
<i>C. albicans</i>	-	0,0(0,0)	0,0(0,0)	0,0(0,0)
<i>C. glabrata</i>	-	0,0(0,0)	0,0(0,0)	0,0(0,0)
<i>C. parapsilosis</i>	-	0,0(0,0)	0,0(0,0)	0,0(0,0)
<i>C. krusei</i>	-	0,0(0,0)	0,0(0,0)	0,0(0,0)
<i>B. cereus</i>	8,8(0,2)	-	-	-
<i>S. aureus</i>	30,7(0,8)	-	-	-
<i>E. coli</i>	9,9(1,3)	-	-	-
<i>S. enteritidis</i>	12,8(1,4)	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	0,0(0,0)	-	-	-

Valores entre parênteses representam \pm o erro padrão da média.

Fonte: Autoria própria.

2.3.2 Atividade Antioxidante *in vitro*

A atividade antioxidante dos compostos alfa-felandreno, cinamaldeído e carvacrol, foi avaliada por três ensaios diferentes: Poder antioxidante pela redução férrica (FRAP),

ensaios de descoloração do radical ABTS e DPPH. Os resultados da média e desvio-padrão dos compostos para os testes ABTS e FRAP estão representados na Tabela 5.

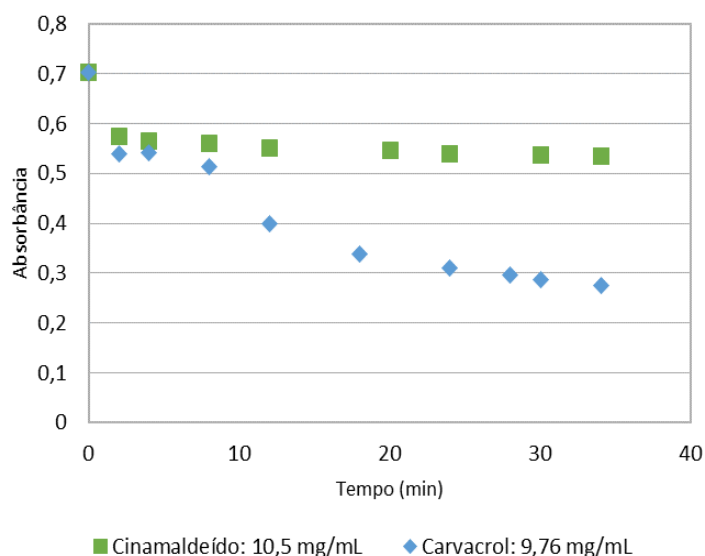
Tabela 5 - Atividade antioxidante dos compostos alfa-felandreno, carvacrol e cinamaldeído segundo métodos de captura de radicais livres ABTS e Poder Antioxidante pela Redução Férrica (FRAP).

Compostos	ABTS	FRAP
	$\mu\text{mol ET/g}$	$\mu\text{mol ET/g}$
Alfa-felandreno	$3,67 \pm 0,40$	-
Carvacrol	$8404,54 \pm 464,20$	$958,85 \pm 17,63$
Cinamaldeído	$0,02 \pm 0,0006$	$1,52 \pm 0,05$

Fonte: Autoria própria (2021)

O tempo de estabilização do DPPH para carvacrol e cinamaldeído foi de 30 minutos, sendo o percentual de redução do DPPH de 59,27% e 23,61% respectivamente. A Figura 11 apresenta o decaimento da absorbância em relação ao tempo, onde é possível observar que o carvacrol se mostrou muito mais eficiente que o cinamaldeído, tanto pelo tempo de reação quanto ao percentual de redução. Essa metodologia se baseia na capacidade dos compostos na captura do radical DPPH evidenciado pelo decaimento da absorbância, assim, quanto mais rápido e maior o decaimento, melhor é a capacidade antioxidante do composto.

Figura 11 – Curva cinética de redução do radical livre DPPH dos compostos majoritários



Fonte: Autoria própria (2021).

Todos os compostos apresentaram alguma atividade antioxidante em pelo menos um ensaio, sendo os melhores resultados apresentados pelo carvacrol, que se destacou nos três

ensaios, sobretudo no método ABTS, com valor de 8404,54 $\mu\text{mol ET/g}$. Acevedo et al., (2007) apresentou valores de ABTS de extratos de orégano com altos teores de carvacrol entre 800 - 2040 mmol Trolox/ kg de planta avaliada, sendo três deles com valores próximos do antioxidante BHT (990 mmol Trolox/ kg) e um com maior atividade que o BHT. Os autores demonstram a eficácia dos compostos naturais em capturar radicais livres e possivelmente substituir antioxidantes sintéticos. Tiveron (2010), relata que a atividade antioxidante por meio da redução do DPPH dos padrões BHT (200 ppm) e Vitamina E (200 ppm), foi de 19% e 96%

Kamimura et al. (2014), avaliando as propriedades antimicrobianas e antioxidantes de complexos encapsulados do carvacrol utilizando Hidroxipropil-b-ciclodextrina (HPBCD), obtiveram uma atividade antioxidante para o composto de 7491 $\mu\text{mol ET/g}$, no entanto observaram que apesar do efeito antimicrobiano ser potencializado com a encapsulação, a atividade antioxidante por sua vez se torna menor. Os autores discutem que este efeito se deve ao fato de ocorrer uma diminuição na disponibilidade do grupo hidroxila da molécula para reagir com os radicais livres.

A estrutura química de substâncias ou misturas está intimamente ligada ao seu potencial de ação antioxidante, em geral os fenóis demonstram melhor atividade antioxidante, podendo doar elétrons ou hidrogênio interrompendo mecanismos de oxidação devido a presença de hidroxilas, logo, supõe-se que quanto mais hidroxilas na molécula maior seu potencial de ação (MORAIS, *et al.*, 2009). Apesar do carvacrol apresentar apenas uma hidroxila, a presença do anel benzênico constitui maior estabilidade a molécula doadora de elétrons e hidrogênio, acelerando o processo de eliminação de radicais livres.

Alguns estudos debatem essa observação, demonstrando que a estrutura química faz toda diferença na ação antioxidante, com base nessa percepção, supõe-se que os valores demonstrados por cinamaldeído em comparação ao carvacrol, são menores possivelmente devido à ausência de hidroxilas na estrutura molecular (MASSODI et al., 2018; SHARMA et al., 2017).

Andrade et al. (2012), relatou em seu estudo com óleos essenciais, que o óleo de *Cinnamomum zeylanicum* Blume (canela) com altos teores de cinamaldeído, não apresentou inibição do radical DPPH, enquanto que os demais óleos com altas concentrações de fenóis, especialmente carvacrol em suas composições, apresentaram atividade antioxidante significativa. Outros autores ainda relatam que a eficiência da ação antioxidante nos métodos DPPH, FRAP e ABTS do cinamaldeído pode aumentar ligeiramente quando encapsulados a complexos de inclusão β -ciclodextrina (JO; CHO; CHUN, 2021).

Neste estudo o alfa-felandreno apresentou efeito oxidativo tanto nos testes de DPPH quando no FRAP, apresentando atividade antioxidante apenas pelo método ABTS. Nos estudos de Scherer (2017), foi relatado que o monoterpene alfa-felandreno apresentou atividade antioxidante nos métodos ABTS e FRAP com valores de IC₅₀ 367,7 e 1619,6 respectivamente, no entanto para o método de DPPH, o mesmo não apresentou atividade alguma. Eryigit et al., (2017), também relatou baixa atividade antioxidante do óleo essencial de *S. molle* contendo alfa-felandreno como composto majoritário, o qual através do método ABTS apresentou valores a 4,7 mM de trolox.

Os métodos ABTS e DPPH apesar de serem considerados simples e de fácil processamento, possuem algumas desvantagens, principalmente relacionadas a falta de uma padronização metodológica que resulta em diversas formas de apresentar os resultados, dificultando a comparação entre estudos, e por serem fisiologicamente irrelevantes, no entanto os ensaios de antioxidante *in vitro* são considerados um parâmetro essencial para a incorporação de novos produtos nas indústrias (TIVERON, 2010).

2.3.3 Atividade Antioxidante *in vivo*

Em suma, o mecanismo de ação desse teste se apresenta na capacidade dos compostos em promover a recuperação da viabilidade celular, ou seja, o menadione como agente estressor reduz a quantidade de células viáveis devido sua toxicidade, logo, ao adicionarmos compostos que possuem ação antioxidante ao meio, as células são capazes de sobreviver. A linhagem GTT1 de *S. cerevisiae* são ainda mais sensíveis aos danos oxidativos induzidos por agentes externos e internos, uma vez que esta levedura apresenta deficiência na produção endógena da enzima glutathione S-transferase (GST), que atua na inativação de espécies reativas de oxigênio. A eficiência do composto avaliado neste método é medida através da taxa de sobrevivência das células em números de células.

Nesse ensaio foram analisadas concentrações entre 1 e 32 µg.mL⁻¹ de cada composto, seguindo uma razão de 2. Nesse intervalo de concentrações não foi observado atividade antioxidante dos compostos, ademais, na concentração máxima observou-se que o carvacrol e cinamaldeído apresentaram efeito inibitório nas células a partir de 4h de incubação. Para o alfa-felandreno, foram realizados testes em concentrações mais altas de 5 mg.mL⁻¹, onde o mesmo apresentou efeito inibitório para a levedura.

Em concentrações acima de $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ já se esperava que houvesse ação inibitória dos compostos carvacrol e cinamaldeído, no entanto as concentrações abaixo não foram o suficiente para demonstrar o efeito antioxidante dos compostos nas células de *S. cerevisiae*. Esses resultados demonstram que os testes de antioxidante *in vivo* utilizando células microbianas não são uma boa alternativa para compostos com alto potencial antimicrobiano, dessa forma, sugere-se o estudo em células eucarióticas animais.

É comum pesquisadores utilizarem camundongos ou células humanas para estudos *in vivo*, tal como nos estudos de Rabie (2013), que utilizando culturas de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y demonstrou que o carvacrol apresentou alta atividade antioxidante na avaliação de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) intracelular e na redução de radicais peroxil.

Outras pesquisas como a de Hsu, Fu-Lan et al. (2012), utilizaram a espécie de nematódeo *Caenorhabditis elegans* em ensaios antioxidantes para analisar o potencial de uma espécie de canela com alto teor de cinamaldeído. Os autores observaram que o óleo essencial da canela exerce atividade antioxidante significativa e que ainda pode fornecer resistência aos nematódeos induzidos ao estresse oxidativo, no entanto, altas doses do composto cinamaldeído puro pode induzir toxicidade.

2.3.4 Teste de Letalidade em *A. salina*.

Esse modelo de ensaio por ser de fácil aplicabilidade, rápido e de baixo custo, é ideal para testes de letalidade preliminares, uma vez que os resultados se apresentam positivos para letalidade é necessário aplicar estudos mais específicos para uma melhor compreensão acerca da toxicidade dos produtos (HARADA, 2009).

No presente estudo concentrações entre $0,06$ e 1 mg.mL^{-1} com diluição seriada de $1/2$ de cada compostos foram testadas para avaliar a mortalidade das artemias, como controle foi testada uma concentração de $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ dos compostos e Tween 80 2% utilizado na diluição dos mesmos.

A toxicidade dos compostos foi avaliada através da contagem de organismos mortos, a partir dessa análise observou-se que em todas as concentrações, com exceção do controle, os compostos apresentaram efeito agudo na letalidade, com mortalidade de 100% dos organismos.

Visto que na concentração de $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a taxa de letalidade foi zero, é necessário ampliar o espectro de concentrações, no entanto deve-se analisar se o estudo de doses extremamente baixas é viável no que diz respeito a aplicabilidade dos compostos.

Autores relacionam o efeito tóxico sobre *A. salina*, com atividades anticancerígena, antifúngica, inseticida e tripanossomicida, além disso, índices de letalidade são comparados ao potencial citotóxico em linhagens de células tumorais (GOMES et al., 2018; LHULLIER; HORTA; FALKENBERG, 2006; SANTO, 2015).

Kim et al. (2018) relatam os efeitos de toxicidade do carvacrol sobre *A. salina* nas concentrações de 5 a $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$, quando o composto passa a apresentar toxicidade acima de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Esses dados complementam o presente trabalho, sendo possível estabelecer que o carvacrol possui uma faixa sem toxicidade de 1 a $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e que a partir dessa concentração o composto apresenta toxicidade. Já para o cinamaldeído, Kunduhoglu (2017) relata que $25,6 \mu\text{L.mL}^{-1}$ do composto com grau de pureza de 95%, é capaz de diminuir pela metade a população de *A. salina*, configurando-o como um produto tóxico.

Outros trabalhos trazem informações do OE de *Thymus vulgaris* L. e do extrato de *Melia azedarach* que possuem em sua composição os compostos carvacrol e cinamaldeído respectivamente a respeito da toxicidade frente aos microcrustáceos. Os autores relatam que $60,38 \mu\text{g.mL}^{-1}$ do OE de *T. vulgaris* L foi capaz de matar 50% dos organismos, se caracterizando como altamente tóxico, já o extrato de *M. azedarach* se caracterizou moderadamente tóxico, com uma taxa de letalidade de 50% acerca de $669 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Apesar dessas espécies apresentarem os compostos de interesse em sua composição, os autores não podem afirmar que o efeito de toxicidade tenha se originado a partir deles (NIKSIC et al., 2021; PIRES JÚNIOR, 2010).

Os OE de *S. molle* e *Schinus Areira* L. que apresentam o composto alfa-felandreno majoritariamente em sua composição, também demonstraram alta toxicidade, com valores de letalidade média de 47 a $96,97 \mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivamente (DO ROSÁRIO MARTINS, 2014; SOLIS QUISPE, 2018).

De fato, os compostos em estudo apresentam potenciais atividades biológicas desde a aplicação farmacológica ao uso na indústria alimentícia, no entanto há uma carência de informações a respeito dos seus mecanismos de ação e de testes que elucidem as lacunas a respeito desses compostos majoritários. Ademais, a literatura científica fornece poucos dados a respeito do uso desse bioensaio para avaliar toxicidade de plantas terrestres.

2.3.5 Potencial citotóxico dos compostos majoritários

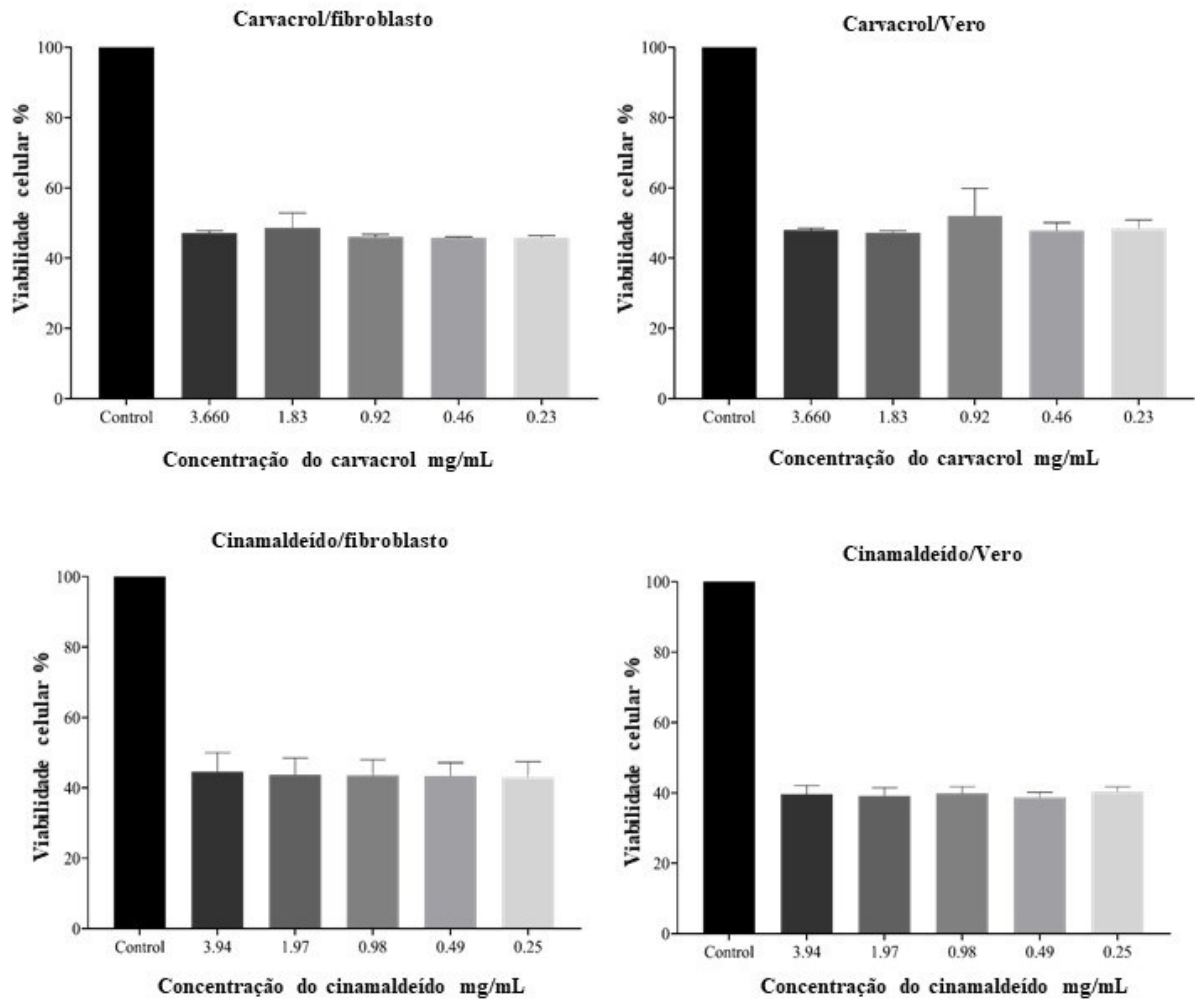
Considerando o potencial efeito antioxidante e antimicrobiano que os compostos carvacrol e cinamaldeído possuem, sua aplicabilidade nas indústrias, principalmente alimentícia e cosmética, são uma alternativa promissora, no entanto, são necessários estudos de citotoxicidade e conseqüentemente de viabilidade celular em uma extensa faixa de concentrações para a comercialização e o uso seguro desses compostos.

Assim a atividade citotóxica dos compostos majoritários carvacrol e cinamaldeído foi avaliada baseado nas concentrações com atividade antimicrobiana sobre células de fibroblasto humano e células Vero, expressos em termos de viabilidade celular (%).

De acordo com a norma ISO 10993-5 2009: Avaliação Biológica de Dispositivos Médicos: Método *In vitro*, a redução em mais de 30% da viabilidade celular, é considerado efeito tóxico, com isso, observa-se que nas concentrações utilizados os compostos majoritários apresentaram citotoxicidade frente as linhagens de célula, uma vez que a viabilidade reduziu em mais de 50% em todos os testes. No caso do controle negativo, utilizando Tween 80, observou-se que nas concentrações testadas ele auxilia na proliferação celular (Figura 12).

Nos estudos de Melo et al. (2014), linhagens de fibroblasto humano normal (MRC5) também foram sensíveis ao composto carvacrol, inibindo 50% do crescimento celular (LC_{50}) em uma concentração de $62,50 \mu\text{g.mL}^{-1}$, já para linhagens tumorais a menor concentração de LC_{50} foi de $31,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$, valores estes, muito menores dos encontrados no presente trabalho. Em contrapartida, uma concentração de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ do carvacrol sobre células de fibroblasto NCTC929, não apresentou taxa de letalidade celular, sendo que ao dobrar essa concentração o percentual de células mortas é igual a 21,62% (SOBRAL-SOUZA et al. 2014). A citotoxicidade do carvacrol também pode estar relacionada, não apenas a diferentes concentrações, como também a diferentes tempos de contato, ou seja, Maquera-Huacho et al. (2018), observou que quanto maior o tempo de exposição ao composto, maior a taxa de letalidade das células de fibroblastos L929.

Figura 12 - Viabilidade celular (%) de células Vero e fibroblasto L929 na presença de diferentes concentrações dos compostos majoritários carvacrol e cinamaldeído



Fonte: Autoria própria (2021).

O carvacrol em sua forma pura, pode ter sua citotoxicidade reduzida quando encapsulado, esse resultado fica evidente nos estudos de Galvão (2019), que relatou uma diferença significativa entre o composto livre e encapsulado sobre células de macrófagos na tentativa de utilizar o composto em terapia de leishmanioses.

Além do encapsulamento, a sinergia entre compostos pode ser uma alternativa promissora para potencializar efeitos antimicrobianos e ainda reduzir a citotoxicidade. Sharma et al. (2020), demonstraram que a nisina como bacteriocina-GAM217 extraída e purificada de *Lactococcus lactis* juntamente com o cinamaldeído, tem uma ação antimicrobiana significativamente mais elevada que os compostos usados separadamente sobre biofilmes de *S. epidermidis* e *E. coli*, e que essa combinação ainda aumenta a viabilidade celular em até 90% de células Vero. Esse efeito sinérgico entre cinamaldeído também é observado em

combinação com timol no trabalho de Sharma et al. (2017), no qual os dois compostos juntos melhoraram em 78% a viabilidade celular em linhagens Vero, enquanto isolados exibiram ~50% de viabilidade celular.

Apesar, dos compostos apresentarem certa toxicidade a algumas células, sua aplicação nesse sentido ainda é de extrema importância e pode ser aplicada de diferentes formas. Tal como nos estudos de Mooyottu et al. (2014), onde o carvacrol e o trans-cinamaldeído, reduziram ~90% da citotoxicidade em células Vero induzidas por toxinas de *Clostridium difficile*, sugerindo que os compostos possuem potencial uso terapêutico na atenuação da virulência dessa espécie patogênica.

Além disso, vale ressaltar que os compostos possuem efeitos excelentes sobre células cancerígenas em testes *in vitro* (LIANG; LU, 2012; ARUNASREE, 2010; KA et al., 2003) e que de acordo com Jaafari et al. (2012), a combinação de pequenas doses do composto carvacrol com drogas anticâncer convencionais, podem produzir um ótimo efeito sinérgico no combate a células tumorais. Estimula-se, portanto, a ideia de que estudos mais aprofundados acerca do potencial citotóxico dos compostos isolados e em sinergia sejam realizados sobre células humanas normais e tumorais, para compreender seus mecanismos de ação e direcionar seu uso terapêutico com efetividade.

3 CONCLUSÕES

Os compostos majoritários carvacrol e cinamaldeído apresentaram elevado potencial antimicrobiano frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas de interesse clínico, além de ótimos fungicidas frente a linhagens de *Candida*, somente o composto alfa-felandreno não apresentou atividade antimicrobiana em nenhum dos ensaios de sensibilidade. Considerando que todas as linhagens microbianas apresentam históricos de multirresistências as drogas convencionais industrializadas e alta patogenicidade, esses resultados são muito relevantes para prospecções no controle de infecções ou na descontaminação de ambientes utilizando compostos naturais, além de diversas outras aplicabilidades comerciais como a adição dos compostos em biofilmes no controle de contaminantes alimentares.

Na avaliação antioxidante *in vitro* foi possível observar um excelente potencial antioxidante do carvacrol, que se destacou nos três diferentes ensaios, seguido do cinamaldeído e por último o alfa-felandreno que apresentou resultados apenas pelo método do radical ABTS. Apesar das análises apontarem uma evidente ação antioxidante, as diferentes metodologias e formas de expressar esses resultados, configuram certa dificuldade no comparativo entre estudos, sendo importante uma padronização para a validação do potencial antioxidante dos compostos. Em todo caso, esse trabalho traz resultados do potencial antioxidante *in vitro* dos compostos sobre uma nova perspectiva, fornecendo assistências a investigações futuras.

O teste antioxidante *in vivo* não se apresentou efetivo na faixa de concentrações testadas, devido a elevada atividade antimicrobiana que os compostos apresentaram sobre a levedura *S. cerevisiae*, com exceção do alfa-felandreno que apresentou inibição em altas concentrações. Esses resultados advertem futuras pesquisas para que novas estratégias sejam adotadas a fim de estabelecer o potencial antioxidante dos compostos em testes *in vivo*, utilizando por exemplo células eucariotas animais.

Por fim, o teste de letalidade em *A. salina* e de citotoxicidade em células Vero e fibroblastos L929 demonstraram alta toxicidade e citotoxicidade, esses resultados complementaram trabalhos existentes expandindo a faixa de concentrações com efeitos tóxicos. Apesar desses resultados configurarem um potencial risco às células humanas, os compostos possuem capacidade de serem aplicados como bioinseticidas ou em sinergismo com outras substâncias no tratamento contra células tumorais por exemplo.

As potenciais aplicações dos compostos carvacrol e cinamaldeído, de fato são altamente relevantes principalmente para o mercado alimentício e farmacêutico, as restrições

desses compostos devido as taxas de toxicidade podem ser revertidas através do estudo de sinergismos entre compostos ou até mesmo por técnicas de encapsulação. Assim, esse trabalho encoraja que mais pesquisas abordem o mecanismo de ação desses compostos em células eucariotas animais e suas citotoxicidades em diferentes metodologias, para que eles sejam utilizados com segurança.

REFERÊNCIAS

- ACEVEDO, A. M. et al. Composición y capacidad antioxidante de especies aromáticas y medicinales con alto contenido de timol y carvacrol. **Scientia et Technica**, v. 13, n. 33, p. 125-128, 2007.
- ADEWOLE, E. et al. Phytochemical, Antimicrobial and Gc-Ms of African Nutmeg (*Monodora myristica*). **Phytochemical, Antimicrobial and Gc-Ms of African Nutmeg (Monodora Myristica)**, v. 2, n. 5, p. 1-8, 2013.
- AHMAD, A. et al. Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v. 30, n. 1, p. 41-50, 2011.
- AIT-OUAZZOU, A. et al. New insights in mechanisms of bacterial inactivation by carvacrol. **Journal of applied microbiology**, v. 114, n. 1, p. 173-185, 2013.
- ALBANO, M. **Atividade antibacteriana e anti-enterotoxinas de compostos fenólicos sobre bactérias de interesse clínico**. 2016.
- ALI, S. M. et al. Antimicrobial activities of Eugenol and Cinnamaldehyde against the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 4, n. 1, p. 20, 2005.
- AMIRI, R.; AKBARI, M. The role of carvacrol as active compound of essential oils in diabetes. **Appl Biol Sci**, v. 12, p. 583-586, 2018.
- ANDRADE, M. A. et al. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 2, p. 399-408, 2012.
- ARUNASREE, K. M. Anti-proliferative effects of carvacrol on a human metastatic breast cancer cell line, MDA-MB 231. **Phytomedicine**, v. 17, n. 8-9, p. 581-588, 2010.
- AYDIN, E; TÜRKEZ, H; KELEŞ, M. S. The effect of carvacrol on healthy neurons and N2a cancer cells: some biochemical, anticancerogenicity and genotoxicity studies. **Cytotechnology**, v. 66, n. 1, p. 149-157, 2014.
- AYDIN, S.; BAŞARAN, A. A.; BAŞARAN, N. Modulating effects of thyme and its major ingredients on oxidative DNA damage in human lymphocytes. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 4, p. 1299-1305, 2005.
- BANERJEE, M.; SARKAR, P.K. Antibiotic resistance and susceptibility to some food preservative measures of spoilage and pathogenic microorganisms from spices. **Food Microbiology**, v. 21, p. 335-342, 2004.
- BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BEN-ARFA, A. et al. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. **Letters in applied microbiology**, v. 43, n. 2, p. 149-154, 2006.

BENDAOUD, H. et al. Chemical composition and anticancer and antioxidant activities of *Schinus molle* L. and *Schinus terebinthifolius* Raddi berries essential oils. **Journal of food Science**, v. 75, n. 6, p. C466-C472, 2010.

BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Analytical biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.

BONA, E. A. M. De et al. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, p. 218-225, 2014.

BRUL, S.; COOTE, P. Preservative agents in foods: mode of action and microbial resistance mechanisms. **International journal of food microbiology**, v. 50, n. 1-2, p. 1-17, 1999.

BULLERMAN, L.B.; LIENU F. Y.; SERIER S.A. Inhibition of growth and aflatoxin production by *cinnamon* and cloves oils, cinnamic aldehyde and eugenol. **J Food Safety**, v. 42, p. 1107-1109, 1977.

BURT, S. A. et al. Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157: H7. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 73, n. 14, p. 4484-4490, 2007.

CAN BASER, K. H. Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. **Current pharmaceutical design**, v. 14, n. 29, p. 3106-3119, 2008.

CATALDO, F.; KEHEYAN, Y.; BACCARO, S. Gamma-radiolysis of chiral molecules: R (+)-limonene, S (-)-limonene and R (-)- α -phellandrene. **Journal of radioanalytical and nuclear chemistry**, v. 262, n. 2, p. 423-428, 2004.

CHALCHAT, J.-C. et al. Correlation between chemical composition and antimicrobial activity. VI. Activity of some African essential oils. **Journal of essential oil research**, v. 9, n. 1, p. 67-75, 1997.

CHAVAN, P. S.; TUPE, S. G. Antifungal activity and mechanism of action of carvacrol and thymol against vineyard and wine spoilage yeasts. **Food Control**, v. 46, p. 115-120, 2014.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Twelfth Edition. CLSI document M02-A12. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.

CRISTANI, M. et al. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 15, p. 6300-6308, 2007.

DA SILVA D. G. et al. Antimicrobial and antioxidant activity of essential oil from pink pepper tree (*Schinus terebinthifolius* Raddi) in vitro and in cheese experimentally contaminated with *Listeria monocytogenes*. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 36, p. 120-127, 2016.

DAL POZZO, M., et al. **Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a Staphylococcus spp isolados de mastite caprina**. *Ciência Rural*, v. 41, p. 667-672, 2011.

DALLEAU, S. et al. In vitro activity of terpenes against *Candida biofilms*. **International journal of antimicrobial agents**, v. 31, n. 6, p. 572-576, 2008.

DE CARVALHO, F. O. et al. Anti-inflammatory and antioxidant activity of carvacrol in the respiratory system: A systematic review and meta-analysis. **Phytotherapy Research**, 2020.

DE LIMA, D. S. et al. Estudo da atividade antibacteriana dos monoterpenos timol e carvacrol contra cepas de *Escherichia coli* produtoras de β -lactamases de amplo espectro. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 8, n. 1, p. 17-21, 2017.

DE LIMA, M. R. F. et al. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **Journal of ethnopharmacology**, v. 105, n. 1-2, p. 137-147, 2006.

DE SILVA, H. V.; SHANKEL, D. M. Effects of the antimutagen cinnamaldehyde on reversion and survival of selected *Salmonella* tester strains. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 187, n. 1, p. 11-19, 1987.

DE SOUZA, J. P. et al. Influence of carvacrol and 1, 8-cineole on cell viability, membrane integrity, and morphology of *Aeromonas hydrophila* cultivated in a vegetable-based broth. **Journal of food protection**, v. 78, n. 2, p. 424-429, 2015.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N.; PRADO, M. R. M. Atividade antimicrobiana de *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 3, p. 617-622, 2005.

DENNING, D. W.; HOPE, W. W. Therapy for fungal diseases: opportunities and priorities. **Trends in microbiology**, v. 18, n. 5, p. 195-204, 2010.

DI PASQUA, R. et al. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 7, p. 2745-2749, 2006.

DIDRY, N.; DUBREUIL, L.; PINKAS, M. Activity of thymol, carvacrol, cinnamaldehyde and eugenol on oral bacteria. **Pharmaceutica Acta Helveticae**, v. 69, n. 1, p. 25-28, 1994.

DO ROSÁRIO MARTINS, M. et al. Antioxidant, antimicrobial and toxicological properties of *Schinus molle* L. essential oils. **Journal of ethnopharmacology**, v. 151, n. 1, p. 485-492, 2014.

DU, E. et al. In vitro antibacterial activity of thymol and carvacrol and their effects on broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*. **Journal of animal science and biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 1-12, 2015.

ELOFF, J. N. Avoiding pitfalls in determining antimicrobial activity of plant extracts and publishing the results. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 19, n. 1, p. 1-8, 2019.

EMBRAPA. **Armazenamento inadequado de grãos resulta em cerca de 15% de perdas**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/3860638/armazenamento-inadequado-de-graos-resulta-em-cerca-de-15-de-perdas>. Acesso em: 03 fev. 2020.

ERYIGIT, T., et al. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant properties of *Schinus molle* L. essential oil from Turkey. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 20, n. 2, p. 570-577, 2017.

ESSER, C.; RANNUG, A.; STOCKINGER, B. The aryl hydrocarbon receptor in immunity. **Trends in immunology**, v. 30, n. 9, p. 447-454, 2009.

ESTRELA, T. S. Resistência antimicrobiana: enfoque multilateral e resposta brasileira. **Brasil, Ministério da Saúde, Assessoria de Assuntos Internacionais de Saúde. Saúde e Política Externa: os**, v. 20, p. 1998-2018, 2018.

FACCIN, Â. Atividade antibacteriana in vitro e in vivo de *Schinus terebinthifolius* Raddi no controle da mastite bovina. 2013. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Pelotas.

FARAG, M. R.; ALAGAWANY, M.; TUFARELLI, V. In vitro antioxidant activities of resveratrol, cinnamaldehyde and their synergistic effect against cyadox-induced cytotoxicity in rabbit erythrocytes. **Drug and chemical toxicology**, v. 40, n. 2, p. 196-205, 2017.

FERHOUT, H. et al. Antifungal activity of selected essential oils, cinnamaldehyde and carvacrol against *Malassezia furfur* and *Candida albicans*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 11, n. 1, p. 119-129, 1999.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da associação médica brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. ExpDes: **Experimental Designs package R package version 1.1.1**. 2011. Disponível em: <https://cran.r-project.org/web/packages/ExpDes.pt/ExpDes.pt.pdf>. Acesso em: 11 set. 2021.

GALVÃO, J. G. **Desenvolvimento de carreadores lipídicos nanoestruturados para o encapsulamento de carvacrol: uma formulação promissora para o tratamento de leishmanioses**. Tese de doutorado, 2019.

GOMES, C. V.; FRINHANI, F. D. M. D. Alimentação saudável como direito humano à saúde: uma análise das normas regulamentadoras da produção de alimentos orgânicos. **Leopoldianum**, v. 43, n. 121, p. 22, 2017.

- GOMES, P. R. B. et al. Caracterização química e citotoxicidade do óleo essencial do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*). **Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas**, v. 47, n. 1, p. 37-52, 2018.
- GONCHAROVA, R. I.; KUZHIR, T. D. A comparative study of the antimitagenic effects of antioxidants on chemical mutagenesis in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 214, n. 2, p. 257-265, 1989.
- GRUENWALD, J.; FREDER, J.; ARMBRUESTER, N. *Cinnamon* and health. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 50, n. 9, p. 822-834, 2010.
- GUARIENTI, C.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Capacidade antioxidante da microalga *Spirulina platensis* em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* submetidas ao estressor paraquat. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 69, n. 1, p. 106-111, 2010.
- GUIMARÃES, A. G. et al. Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 107, n. 6, p. 949-957, 2010.
- HAMEED, I. H.; ALTAMEME, H. J.; MOHAMMED, G. J. Evaluation of antifungal and antibacterial activity and analysis of bioactive phytochemical compounds of *Cinnamomum zeylanicum* (Cinnamon bark) using gas chromatography-mass spectrometry. **Oriental Journal of Chemistry**, v. 32, n. 4, p. 1769, 2016.
- HARADA, T. N. Correlação entre os ensaios de citotoxicidade em *Artemia salina* Leach e atividade antineoplásica sobre linhagens de células tumorais para algumas classes de produtos naturais. **Tese de mestrado**. 2009.
- HARBISON, R. D.; BOURGEOIS, M. M.; JOHNSON, G. T. **Hamilton and hardy's industrial toxicology**. John Wiley & Sons, 2015.
- HOCMAN, G. Chemoprevention of cancer: phenolic antioxidants (BHT, BHA). **International Journal of Biochemistry**, v. 20, n. 7, p. 639-651, 1988.
- HSIEH, Shu-Ling et al. Induction of necrosis in human liver tumor cells by α -phellandrene. **Nutrition and cancer**, v. 66, n. 6, p. 970-979, 2014.
- HSU, Fu-Lan et al. In vivo antioxidant activities of essential oils and their constituents from leaves of the Taiwanese *Cinnamomum osmophloeum*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 12, p. 3092-3097, 2012.
- HUANG, Shyh-Shyun et al. Antioxidant and antiproliferative activities of the four *Hydrocotyle* species from Taiwan. **Botanical Studies**, v. 49, n. 4, p. 311-322, 2008.
- İŞCAN, G. et al. Biotransformation of (–)-(R)- α -Phellandrene: Antimicrobial Activity of Its Major Metabolite. **Chemistry & biodiversity**, v. 9, n. 8, p. 1525-1532, 2012.

- JAAFARI, A. et al. Comparative study of the antitumor effect of natural monoterpenes: relationship to cell cycle analysis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 3, p. 534-540, 2012.
- JO, Y. J.; CHO, H. S.; CHUN, J. Y. Antioxidant activity of β -cyclodextrin inclusion complexes containing trans-cinnamaldehyde by DPPH, ABTS and FRAP. **Food Science and Biotechnology**, p. 1-8, 2021.
- JOHANN, S. et al. Inhibitory effect of extracts from Brazilian medicinal plants on the adhesion of *Candida albicans* to buccal epithelial cells. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 11, p. 2459-2464, 2008.
- KA, H. et al. Cinnamaldehyde induces apoptosis by ROS-mediated mitochondrial permeability transition in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. **Cancer letters**, v. 196, n. 2, p. 143-152, 2003.
- KAMIMURA, J. A. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of carvacrol microencapsulated in hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. **LWT-Food Science and Technology**, v. 57, n. 2, p. 701-709, 2014.
- KHAN, M. S. A; AHMAD, I.; CAMEOTRA, S. S. Phenyl aldehyde and propanoids exert multiple sites of action towards cell membrane and cell wall targeting ergosterol in *Candida albicans*. **Amb Express**, v. 3, n. 1, p. 54, 2013.
- KIM, Hyunwoo et al. Biocidal effect of thymol and carvacrol on aquatic organisms: Possible application in ballast water management systems. **Marine pollution bulletin**, v. 133, p. 734-740, 2018.
- KING, A. A. et al. Antimutagenicity of cinnamaldehyde and vanillin in human cells: Global gene expression and possible role of DNA damage and repair. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 616, n. 1-2, p. 60-69, 2007.
- KIRIMER, N., BAŞER, K.H.C.; TÜMEN, G. Carvacrol-rich plants in Turkey. **Chem Nat Compd** 31, 37–41, 1995.
- KUNDUHOGLU, B. Anti-yeast activity of cinnamaldehyde, eugenol and linalool. **World J Res Rev**, v. 5, n. 5, p. 32-34, 2017.
- LAMBERT, R. J. W. et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of applied microbiology**, v. 91, n. 3, p. 453-462, 2001.
- LHULLIER, C.; HORTA, P. A.; FALKENBERG, M. Avaliação de extratos de macroalgas bênticas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 158-163, 2006.
- LIANG, Wei Zhe; LU, Cheng Hsien. Carvacrol-induced $[Ca^{2+}]_i$ rise and apoptosis in human glioblastoma cells. **Life sciences**, v. 90, n. 17-18, p. 703-711, 2012.

LIMA, D. F. et al. Antinociceptive activity of the monoterpene α -phellandrene in rodents: possible mechanisms of action. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 64, n. 2, p. 283-292, 2012.

LIMA, D. S. et al. Study of the antibacterial activity of thymol and carvacrol monoterpenes against strains of *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases/Estudo da atividade antibacteriana dos monoterpenos timol e carvacrol contra cepas de *Escherichia coli* produtoras de β -lactamases de amplo espectro. **Rev Pan-Amaz Saude**, p. 17-21, 2017.

LIMA, I. O. et al. Antifungal activity and mode of action of carvacrol against *Candida albicans* strains. **Journal of essential oil research**, v. 25, n. 2, p. 138-142, 2013.

LIMA, J. C. Estudo da atividade antifúngica dos fitoconstituintes carvacrol e timol contra cepas de *Aspergillus* spp.: aplicabilidade em grãos de milho. 2017. 52 f. **Monografia** (Curso de Graduação em Farmácia) – Centro de Educação e Saúde, Universidade Federal de Campinas Grande, Paraíba, 2017.

LIN, J. J. et al. Alpha-phellandrene promotes immune responses in normal mice through enhancing macrophage phagocytosis and natural killer cell activities. **in vivo**, v. 27, n. 6, p. 809-814, 2013.

LINDENSCHMIDT, R. C. et al. The effects of dietary butylated hydroxytoluene on liver and colon tumor development in mice. **Toxicology**, v. 38, n. 2, p. 151-160, 1986.

MACHADO, B. F. M T; JUNIOR, A. F. Óleos essenciais: aspectos gerais e usos em terapias naturais. **Cadernos Acadêmicos**, v. 3, n. 2, p. 105-127, 2011.

MACHADO, D. G. et al. Antidepressant-like effect of the extract from leaves of *Schinus molle* L. in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 31, n. 2, p. 421-428, 2007.

MAGI, G.; MARINI, E.; FACINELLI, B. Antimicrobial activity of essential oils and carvacrol, and synergy of carvacrol and erythromycin, against clinical, erythromycin-resistant Group A *Streptococci*. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 165, 2015.

MASSODI, M. L. E. et al. Chemical Composition and Antioxidant Activity of *Syzygium aromaticum* and *Monodora myristica* Essential Oils from Cameroon. **Journal of Food Stability**, v. 1, n. 1, p. 1-13, 2018.

MASTELIC, J. et al. Comparative study on the antioxidant and biological activities of carvacrol, thymol, and eugenol derivatives. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, n. 11, p. 3989-3996, 2008.

MEDEIROS, F. C. M. de. Caracterização química e atividade biológica de óleos essenciais de plantas do Cerrado contra fungos xilófagos. 2014.

MELO, J. O. de et al. Cytotoxic effects of essential oils from three *Lippia gracilis* Schauer genotypes on HeLa, B16, and MCF-7 cells and normal human fibroblasts. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 02, p. 2691-2697, 2014.

- MENG, Dan et al. Antioxidant activity evaluation of dietary phytochemicals using *Saccharomyces cerevisiae* as a model. **Journal of functional foods**, v. 38, p. 36-44, 2017.
- MEYER, B. N. et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta medica**, v. 45, n. 05, p. 31-34, 1982.
- MEZZOUG, N. et al. Investigation of the mutagenic and antimutagenic effects of *Origanum compactum* essential oil and some of its constituents. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 629, n. 2, p. 100-110, 2007.
- MOOYOTTU, S. et al. Carvacrol and trans-cinnamaldehyde reduce *Clostridium difficile* toxin production and cytotoxicity in vitro. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 3, p. 4415-4430, 2014.
- MORAIS, Selene M. de et al. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 19, p. 315-320, 2009.
- MOUSAVI, Fatemeh et al. Cinnamaldehyde characterization as an antibacterial agent toward *E. coli* metabolic profile using 96-blade solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of proteome research**, v. 15, n. 3, p. 963-975, 2016.
- MUÑOZ-ACEVEDO, A., MATÍNEZ J. R., STASHENKO E. S. Cromatografía de gases como herramienta de estudio de la composición química y capacidad antioxidante de especies vegetales ricas en timol y carvacrol, cultivadas en Colombia. **Scientia Chromatographica**, p. 67-78, 2009.
- NCBI. PubChem Database. alpha-Phellandrene, CID=7460. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/alpha-Phellandrene>. Acesso em: 15 mar. 2020.
- NCBI. PubChem Database. Carvacrol, >=98%, FCC, FG, Source=Sigma-Aldrich, SID=24900943. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/24900943>. Acesso em: 26 fev. 2020.
- NCBI. PubChem Database. Cinnamaldehyde, CID=637511. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cinnamaldehyde>. Acesso em: 13 mai. 2020.
- NCCLS. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada—Segunda Edição**. NCCLS document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002.
- NCCLS. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition**. NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.
- NIKSIC, H. et al. Cytotoxicity screening of *Thymus vulgaris* L. essential oil in brine shrimp nauplii and cancer cell lines. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1-9, 2021.

NÓBREGA, R. de O. et al. Investigation of the antifungal activity of carvacrol against strains of *Cryptococcus neoformans*. **Pharmaceutical biology**, v. 54, n. 11, p. 2591-2596, 2016.

OHTA, T. et al. Analysis of the antimutagenic effect of cinnamaldehyde on chemically induced mutagenesis in *Escherichia coli*. **Molecular and General Genetics MGG**, v. 192, n. 3, p. 309-315, 1983.

OHTA, T. Modificação da genotoxicidade por aromas que ocorrem naturalmente e seus derivados. **Revisões críticas em toxicologia**, v. 23, n. 2, p. 127-146, 1993.

OXIDATIVO, P. N. Estresse. Antioxidantes. **Primera edicin. Canoas-RS (Brasil). Editora da ULBRA**, 2002.

PÍREZ, M.; MOTA, M. Morfología y estructura bacteriana. **Temas de bacteriología y virología médica**, 2006.

PIRES JÚNIOR, H. B. et al. Efeitos toxicológicos agudos de extratos de *Melia azedarach* (MELIACEAE) em ratos (*Rattus norvegicus*), camundongos (*Mus musculus*) e *Artemia salina*. **Tese de mestrado**. 2010.

PONCE, A. G. et al. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. **LWT-Food Science and Technology**, v. 36, n. 7, p. 679-684, 2003.

RABIE, S. M. S. **Avaliação das propriedades redox-ativas e citotóxicas ou citoprotetoras do carvacrol em cultura de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y**. 2013.

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.

ROCHA, L. Antibióticos: resistência de microrganismos é grave ameaça à saúde global. **FIOCRUZ**, 19 de nov. de 2019. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/noticia/antibioticos-resistencia-de-microrganismos-e-grave-ameaca-saude-global>. Acesso em: 23 ago. de 2021.

RSTUDIO TEAM. Integrated Development for R. 2016. RStudio, Boston, MA. Disponível em: <http://www.rstudio.com/>. Acesso em: 11 set. 2021.

RUFINO, M. D. S. M. et al. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Embrapa Agroindústria Tropical- Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2007.

SANLA-EAD, N. et al. Antimicrobial activity of cinnamaldehyde and eugenol and their activity after incorporation into cellulose-based packaging films. **Packaging Technology and Science**, v. 25, n. 1, p. 7-17, 2012.

SANTURIO, J. M. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. **Ciência Rural**, v. 37, p. 803-808, 2007.

SCHERER, M. M. de Christo. Atividades antioxidante e anti-inflamatória in vitro dos monoterpenos beta-citronelol, alfa-felandreno, terpinoleno e sabineno. 2017. **Tese de Doutorado**.

SEVERINO, R. P. Busca de produtos naturais como inibidores específicos de enzimas. 2008.

SHARMA, G. et al. Inhibitory effect of cinnamaldehyde alone and in combination with thymol, eugenol and thymoquinone against *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Herbal Medicine**, v. 9, p. 68-73, 2017.

SHARMA, G. et al. Synergistic antibacterial and anti-biofilm activity of nisin like bacteriocin with curcumin and cinnamaldehyde against ESBL and MBL producing clinical strains. **Biofouling**, v. 36, n. 6, p. 710-724, 2020.

SHARMA, U. K. et al. Pharmacological activities of cinnamaldehyde and eugenol: antioxidant, cytotoxic and anti-leishmanial studies. **Cellular and Molecular Biology**, v. 63, n. 6, p. 73-78, 2017.

SHAUGHNESSY, D. T.; SETZER, R. W.; DEMARINI, D. M. The antimutagenic effect of vanillin and cinnamaldehyde on spontaneous mutation in *Salmonella* TA104 is due to a reduction in mutations at GC but not AT sites. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 480, p. 55-69, 2001.

SHREAZ, S. et al. Influences of cinnamic aldehydes on H⁺ extrusion activity and ultrastructure of *Candida*. **Journal of medical microbiology**, v. 62, n. 2, p. 232-240, 2013.

SHREAZ, S. et al. Spice oil cinnamaldehyde exhibits potent anticandidal activity against fluconazole resistant clinical isolates. **Fitoterapia**, v. 82, n. 7, p. 1012-1020, 2011.

SHUTTERSTOCK. **Movement larvae, nauplios *Artemia salina***. Disponível em: <https://www.shutterstock.com/es/video/clip-1023170383-movement-larvae-nauplios-artemia-salina>. Acesso em: 28 dez. 2021.

SILVA, C. T. da; JASIULIONIS, M. G. Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer. **Ciência e Cultura**, v. 66, n. 1, p. 38-42, 2014.

SINGH, G. et al. A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. **Food and chemical toxicology**, v. 45, n. 9, p. 1650-1661, 2007.

SLAMENOVA, D. et al. Carvacrol given to rats in drinking water reduces the level of DNA lesions induced in freshly isolated hepatocytes and testicular cells by H₂O₂. **Neoplasma**, v. 55, n. 5, p. 394, 2008.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SOBRAL-SOUZA, Celestina E. et al. Avaliação da atividade citotóxica e potencial antiparasitário in vitro do α -pineno e carvacrol. **Acta toxicol Argent**, v. 22, n. 2, p. 76-80, 2014.

SOLIS QUISPE, A. Composición química de los aceites esenciales de *Schinus areira* Linneo Y *Minthostachys spicata* (Benth) Epling y ensayos de toxicidad en *Artemia salina* Leach y en ratones albinos. **Tese de doutorado**. 2018.

SOUZA, T. R. de; SILVA, M. A. da; PICCOLI, R. H. Inativação termoquímica de *Staphylococcus aureus* ao cinamaldeído. **Hig. alim.**, p. 1883-1886, 2019.

STINCO, Carla M. et al. Hydrophilic antioxidant compounds in orange juice from different fruit cultivars: Composition and antioxidant activity evaluated by chemical and cellular based (*Saccharomyces cerevisiae*) assays. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 37, p. 1-10, 2015.

STOCKINGER, B. et al. External influences on the immune system via activation of the aryl hydrocarbon receptor. In: **Seminars in immunology**. Academic Press, p. 99-105, 2011.

TAGUCHI, Y. et al. The effect of cinnamaldehyde on the growth and the morphology of *Candida albicans*. **Medical molecular morphology**, v. 46, n. 1, p. 8-13, 2013.

TEIXEIRA, J. J. M. et al. Antimicrobial analysis of the essential oils of palmarosa (*Cymbopogon martini* (Roxb.) JF Watson) and pink pepper (*Schinus terebenthifolius* Raddi) in front of *Staphylococcus aureus* multi-resistant. **Brazilian J. Dev**, v. 6, p. 34935-34953, 2020.

TIAN, Wei-Lu et al. Physical stability and antimicrobial activity of encapsulated cinnamaldehyde by self-emulsifying nanoemulsion. **Journal of Food Process Engineering**, v. 39, n. 5, p. 462-471, 2016.

TIVERON, Ana Paula. Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil. 2010. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo.

TSAO, R.; ZHOU, T. Antifungal activity of monoterpenoids against postharvest pathogens *Botrytis cinerea* and *Monilinia fructicola*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 12, n. 1, p. 113-121, 2000.

UCHI, H. et al. Inhibition of aryl hydrocarbon receptor signaling and induction of NRF2-mediated antioxidant activity by cinnamaldehyde in human keratinocytes. **Journal of dermatological science**, v. 85, n. 1, p. 36-43, 2017.

ULTEE, A.; BENNIK, M. H. J.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Appl. Environ. Microbiol**, v. 68, n. 4, p. 1561-1568, 2002.

ULTEE, A.; KETS, E. P. W.; SMID, E. J. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Appl. Environ. Microbiol**, v. 65, n. 10, p. 4606-4610, 1999.

VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-biological interactions**, v. 160, n. 1, p. 1-40, 2006.

- WANG, H. et al. Synthesis, antimicrobial activity of Schiff base compounds of cinnamaldehyde and amino acids. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 26, n. 3, p. 809-813, 2016.
- WANG, Sheng-Yang; CHEN, Pin-Fun; CHANG, Shang-Tzen. Antifungal activities of essential oils and their constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) leaves against wood decay fungi. **Bioresource technology**, v. 96, n. 7, p. 813-818, 2005.
- YE, H. et al. Synergistic interactions of cinnamaldehyde in combination with carvacrol against food-borne bacteria. **Food Control**, v. 34, n. 2, p. 619-623, 2013.
- ZARDO, V.; MEZZARI, A. Os antifúngicos nas infecções por *Candida* sp. **NewsLab**, v. 63, p. 136-46, 2004.
- ZHANG, Ji-hong et al. Anti-fungal activity, mechanism studies on α -Phellandrene and Nonanal against *Penicillium cyclopium*. **Botanical studies**, v. 58, n. 1, p. 1-9, 2017.
- ZHANG, Yunbin et al. Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Food Control**, v. 59, p. 282-289, 2016.