



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

KILMA GABRIELLE BARBOSA PIMENTEL

**AVALIAÇÃO TÉRMICA E BIOLÓGICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE ORIGEM
COMERCIAL**

CAMPINA GRANDE

2022

KILMA GABRIELLE BARBOSA PIMENTEL

**AVALIAÇÃO TÉRMICA E BIOLÓGICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE ORIGEM
COMERCIAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Desenvolvimento e controle da qualidade de produtos farmacêuticos.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Hugo Alencar Fernandes.

CAMPINA GRANDE

2022

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

P644a Pimentel, Kilma Gabrielle Barbosa.
Avaliação térmica e biológica de óleos essenciais de origem comercial [manuscrito] / Kilma Gabrielle Barbosa Pimentel. - 2022.
65 p.

Digitado.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2022.

"Orientação : Prof. Dr. Felipe Hugo Alencar Fernandes, Departamento de Farmácia - CCBS."

1. Cinética de degradação. 2. Atividade antimicrobiana. 3. Óleos essenciais. I. Título

21. ed. CDD 615.19

KILMA GABRIELLE BARBOSA PIMENTEL

**AVALIAÇÃO TÉRMICA E BIOLÓGICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE ORIGEM
COMERCIAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Área de concentração: Desenvolvimento e controle de qualidade de produtos farmacêuticos.

APROVADA EM: 18/04/2022

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Felipe Hugo Alencar Fernandes
Universidade Estadual da Paraíba - UEPB



Prof^ª. Dra. Jozinete Vieira Pereira
Universidade Estadual da Paraíba - UEPB
(Examinador interno)



Prof^ª. Dra. Cinthya Maria Pereira de Souza
UNIFACISA – Centro Universitário
(Examinador externo)

Aos meus maiores apoiadores, meus pais Lino e
Kenia Pimentel e a minha avó Irene, DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a Virgem Maria que desde sempre me abençoaram com força, dedicação e perseverança para dedicar minha vida aos estudos, me dando força espiritual para superar os desafios e hoje realizar um sonho fruto dos meus pedidos em oração.

Aos meus pais, Lino e Kenia Pimentel e a minha avó Irene, meus maiores apoiadores que fizeram do pouco que tinham o suficiente para me proporcionar a melhor educação desde pequena. Superamos a saudade, à distância, as preocupações e hoje eu começo a retribuir um pouquinho de tudo aquilo que vocês fizeram por mim. Obrigada por sempre acreditarem em mim e nos meus sonhos. Essa conquista é para vocês.

A minha irmã Keila por todo apoio e confiança sincera que depositou em mim durante esse período. Suas mensagens de força e apoio fizeram toda a diferença. Agradeço também a todos os tios, tias e primos que, de alguma forma, contribuíram com uma palavra de afeto quando eu precisei.

Aos anjos que Deus me presenteou aqui na Terra, os meus sobrinhos: Mirella, Luiz Guilherme, Jonas e Elloah. A alegria e a pureza de vocês renovavam minhas forças todo final de semana e, mesmo sem ter ideia, foram meu alicerce de amor e de perseverança nessa jornada. Como eu amo vocês!

Aos meus amigos, Adson Silva e Rosângela Travassos, que compartilharam comigo os dias mais difíceis e os mais felizes durante esses dois anos, sendo o meu braço direito para tudo. Obrigada por toda leveza, paciência e cuidado que teve comigo. Vocês, juntamente com Jaysa e Mayara, João Vítor, Mariana Dantas, Vimerson, Renata e Thaysa foram responsáveis pelos melhores momentos de altos e baixos que eu tive. Muito obrigada, de coração!

Aos meus companheiros de pesquisa, Vimerson, Jessé, Niédja, Ana Clara e Rodrigo minha eterna gratidão. Isso só foi possível graças à colaboração de vocês. Obrigada por me aturarem, me ajudarem na execução desse projeto, fazendo dessa conquista um exemplo de companheirismo que levarei para vida toda. Quantos momentos inesquecíveis vivemos naquele laboratório. Obrigada!

Aos meus colegas da graduação: Jessé, Rayane, Analara, Misael, Alessandra, Esdras, Yasmim e Karen por terem me acolhido no curso de Farmácia desde o início. Vocês tornaram esse fardo mais leve e foram meu ponto de apoio sempre que eu pensava em desistir. Serei eternamente grata!

A Cinthya e Márcio que foram e continuam sendo meus pais aqui em Campina Grande, como prova do cuidado de Deus para comigo. Sem Cinthya, sem dúvida, não estaria seguindo

essa trajetória. Jamais esquecerei de toda força que vocês me deram para além da vida acadêmica. Vocês fazem a diferença!

Aos profissionais que cuidaram atentamente da minha saúde durante esse período: Marília Bezerra, Jéssica Carlos, Hartur Ferreira e Nathália Cordeiro. Direta ou indiretamente, vocês me conduziram pelo melhor caminho para que essa fase tão intensa pudesse ser menos desgastante. Sinto-me privilegiada por ter conseguido conciliar hábitos saudáveis em meio a uma rotina de dupla jornada. Muito obrigada!

Aos professores do LABDEM e aos professores da banca de qualificação e defesa pela disponibilidade em realizar as correções de maneira sábia, visando o aprimoramento da presente pesquisa.

Aos que fazem o PPGCF pela oportunidade e paciência, bem como a UEPB que, juntos, me acolheram e possibilitaram todos os meios necessários para a minha formação.

Por fim, agradeço ao meu querido orientador Felipe Hugo, responsável pela condução desse projeto, por toda sua paciência, compreensão e leveza para lidar com as inúmeras dificuldades que passamos. Nessa jornada dupla, não poderia ter tido apoio melhor. Obrigada por toda paciência e aprendizado compartilhado. Nós conseguimos!

“Eu nunca quis o fácil.
E o fácil – agora- é fácilimo.
Busco além do difícil,
o difícilimo.”

Antônio Riséri

RESUMO

Os óleos essenciais (OEs) constituem-se como uma alternativa para o desenvolvimento de formulações que possam combater a resistência dos microrganismos aos agentes antimicrobianos. Todavia, visando uma melhor aplicabilidade destes produtos, estudos envolvendo a caracterização química e biológica se fazem necessários. Assim, este trabalho teve por objetivo avaliar o potencial microbiológico e citotóxico, bem como as características termoanalíticas de quatro OEs essenciais de origem comercial. Os óleos foram adquiridos de uma empresa de cosméticos nacional, obtidos a partir de diferentes espécies de plantas: lavanda, laranja, limão e menta. Para a análise microbiológica foram utilizados os testes de microdiluição em caldo, para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida/Fungicida Mínima (CBM/CFM), teste de suscetibilidade microbiana por difusão em ágar e o teste de curva de morte (*time-kill*), utilizando cepas ATCC *Staphylococcus aureus* (ATCC 17193), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Candida albicans* (ATCC 10231). A citotoxicidade dos óleos também foi avaliada *in vitro* pelo teste de hemólise. A avaliação do perfil térmico dos OEs foi realizada por meio de técnicas Termogravimétricas (TG) e Análise Térmica Diferencial (DTA), além determinação da energia de ativação (E_a) pelo modelo cinético de degradação térmica utilizando os métodos de Flynn-Wall-Ozawa (FWO) e Kissinger-Akahira-Sunose (KAS). Como resultado, observou-se que todos os OEs apresentaram atividade antimicrobiana, sendo o OE de laranja o que apresentou melhor atividade contra as cepas testadas. A cepa de *C. albicans* foi a que demonstrou maior sensibilidade aos OEs (CIM = 0,25 mg/mL). Na curva de morte diferentes comportamentos foram observados nos OEs testados, que variam de acordo com a concentração. Na análise termogravimétrica, todos os OEs apresentaram apenas um evento térmico correspondente a volatilização que foi observado também pelas curvas de DTA. O OE de laranja foi o que apresentou menor temperatura inicial de degradação (58,43 °C), bem como menor E_a determinada pelos métodos FWO (29,07 °C) e KAS (36,01 °C). No ensaio de citotoxicidade, os OEs apresentaram toxicidade baixa (< 40%), sendo considerados pouco tóxicos. Assim, é possível inferir que os resultados obtidos fornecem subsídios complementares para literatura científica no que diz respeito a análise microbiológica e caracterização térmica de OEs, visando a realização de estudos posteriores que objetivem a aplicação destas substâncias em formulações farmacêuticas.

Palavras-chave: Cinética de degradação. Atividade antimicrobiana. Óleos essenciais.

ABSTRACT

Essential oils (EOs) are an alternative for the development of formulations that can combat the resistance of microorganisms to antimicrobial agents. However, aiming a better applicability of these products, studies involving chemical and biological characterization are necessary, mainly because they are volatile substances. Thus, this work aimed to evaluate the microbiological and cytotoxic potential, as well as the thermoanalytical characteristics of four essential EOs of commercial origin. The oils were purchased from a national cosmetics company, obtained from different species of plants: lavender, orange, lemon and mint. For the microbiological analysis, the broth microdilution tests were used to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal/Fungicide Concentration (MBC/CFM), microbial susceptibility test by diffusion in agar and the death curve test (time-kill), using ATCC strains *Staphylococcus aureus* (ATCC 17193), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) and *Candida albicans* (ATCC 10231). The cytotoxicity of the oils was also evaluated in vitro by the hemolysis test. The evaluation of the thermal profile of the EOs was carried out using Thermogravimetric (TG) and Differential Thermal Analysis (DTA) techniques, in addition to determining the activation energy (Ea) by the kinetic model of thermal degradation using the Flynn-Wall-Ozawa methods (FWO) and Kissinger-Akahira-Sunose (KAS). As a result, it was observed that all EOs showed antimicrobial activity, being the orange EO the one that showed the best activity against the tested strains. *C. albicans* strain showed the greatest sensitivity to EOs (MIC = 0.25 mg/mL). In the death curve, different behaviors were observed in the EOs tested, which vary according to the concentration. In the thermogravimetric analysis, all EOs presented only one thermal event corresponding to volatilization, which was also observed by the DTA curves. This event occurs at different temperatures for each of the EOs and the orange EO showed the lowest initial temperature of degradation (58.43 °C), as well as the lowest Ea determined by the FWO (29.07 °C) and KAS (36 .01°C). In the cytotoxicity assay, the EOs showed low toxicity (< 40%), being considered little toxic. Thus, it is possible to infer that the results obtained provide complementary subsidies for scientific literature with regard to microbiological analysis and thermal characterization of EOs, aiming at carrying out further studies aimed at the application of these substances in pharmaceutical formulations.

Keywords: Kinetics degradation. Antimicrobial activity. Essential oils.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Monoterpenos. (a) limoneno (b) mirceno (c) α -pineno (d) β -pineno	18
Figura 2 - Exemplo de sesquiterpenos: β -cariofileno.....	19
Figura 3 - Estrutura química dos principais exemplos de terpenoides	19
Figura 4 - Estrutura química de fenóis	20
Figura 5 - <i>Lavandula hybrida</i> e seus principais constituintes	21
Figura 6 - <i>Citrus sinensis</i> e o principal constituinte do OE.....	22
Figura 7 - Limão e o principal constituinte do OE, l-limoneno	23
Figura 8 - <i>Mentha piperita</i> e os principais constituintes do seu óleo essencial	24
Figura 9 - Principais mecanismos de ação dos OEs na célula bacteriana	26
Figura 10 - Esquema de microdiluição em placa de 96 poços	32
Figura 11 - Ensaio da atividade antibacteriana (a) técnica de microdiluição em caldo e (b) difusão em ágar.....	37
Figura 12 - Curva de morte do <i>S. aureus</i> após aplicação dos OEs.....	43
Figura 13 - Potencial hemolítico dos OEs	45
Figura 14 - (a) TG do OE-01; (b) DTA do OE-01	47
Figura 15 - (a) TG do OE-02; (b) DTA do OE-02	48
Figura 16 – (a) TG do OE-03; (b) DTA do OE-03.....	49
Figura 17 – (a) TG do OE-04; (b) DTA do OE-04.....	49
Figura 18 – Gráficos para os métodos isoconversionais (a) Flynn–Wall–Ozawa e (b) Kissinger–Akahira–Sunose (KAS) do OE – 01	53
Figura 19 – Gráficos para os métodos isoconversionais (a) Flynn–Wall–Ozawa e (b) Kissinger–Akahira–Sunose (KAS) do OE – 02	54
Figura 20 – Gráficos para os métodos isoconversionais (a) Flynn–Wall–Ozawa e (b) Kissinger–Akahira–Sunose (KAS) do OE – 03	55
Figura 21 – Gráficos para os métodos isoconversionais (a) Flynn–Wall–Ozawa e (b) Kissinger–Akahira–Sunose (KAS) do OE – 04	56
Figura 22 – Comparação dos modelos cinéticos FWO e KAS.....	58

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	14
2.1	Objetivo Geral	14
2.2	Objetivos Específicos	14
3	REFERENCIAL TEÓRICO	15
3.1	Óleos essenciais	15
3.1.1	Histórico	15
3.1.2	Definição, características físico-químicas e obtenção	16
3.1.3	Composição química	17
3.1.4	Óleo essencial de lavanda (<i>Lavandula</i> sp)	20
3.1.5	Óleo essencial de laranja (<i>Citrus sinensis</i>)	21
3.1.6	Óleo essencial de limão (<i>Citrus limon</i>)	22
3.1.7	Óleo essencial de menta (<i>Mentha avernensis</i> / <i>Mentha piperita</i>)	23
3.1.8	Atividade antimicrobiana dos OEs	24
3.1.9	Avaliação da atividade antimicrobiana dos OEs	27
3.2	Análise Térmica	28
3.2.1	Cinética de degradação térmica	29
4	MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1	Materiais	31
4.1.1	Obtenção dos óleos essenciais	31
4.1.2	Linhagens bacterianas	31
4.2	Métodos	32
4.2.1	Avaliação da atividade antimicrobiana	32
4.2.2	Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> pelo ensaio de atividade hemolítica	34
4.2.3	Efeitos dos OEs nas curvas de tempo de morte bacteriana (<i>time-kill</i>)	35
4.2.4	Análise Térmica Diferencial (DTA) e Termogravimetria (TG)	35

4.2.5	Degradação cinética não-isotérmica	36
4.3	Análise Estatística	36
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1	Avaliação da Atividade antimicrobiana	37
5.2	Efeitos dos OEs nas curvas de tempo de morte bacteriana (time-kill)	42
5.3	Avaliação da toxicidade <i>in vitro</i> pelo ensaio de atividade hemolítica	44
5.4	Análise Termogravimétrica Diferencial (DTA) e Termogravimetria (TG) ...	46
5.5	Cinética de degradação não isotérmica	52
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
	REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

Definidos como produtos naturais concentrados de composição variada, os óleos essenciais (OEs) são produzidos por plantas aromáticas como metabólitos secundários. Estas substâncias apresentam menor potencial para o desenvolvimento de resistência microbiana em razão da variedade de constituintes naturais em sua composição. Isso implica em uma atividade considerada “multialvo” contra as bactérias resistentes à antibióticos, constituindo assim uma vantagem quando comparada à resposta para um único alvo que é obtida pelos antibióticos convencionais (TRIFAN et al., 2020; NAZARRO, et al., 2013).

Os derivados naturais como os OEs, podem diminuir a dependência total de antimicrobianos tradicionais, reduzir e/ou combater a resistência antimicrobiana (VOON; BHAT; RUSUL, 2012). Dentre as espécies que apresentam resistência, destacam-se a *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp*, *Staphylococcus coagulase-negativo*, *Shigella*, *Enterococcus sp* e *Escherichia coli* que são espécies comumente associadas a infecções hospitalares (CHOUHAN; SHARMA; GULERIA, 2017).

O potencial antimicrobiano dos OEs para diferentes microrganismos, ocorre pela presença de diferentes compostos bioativos em diferentes proporções na sua composição. Estes constituintes podem atuar como agentes de ruptura na membrana das bactérias, provocando vazamento de conteúdo celular e coagulação do citoplasma, que são componentes vitais da célula bacteriana (TRIFAN et al., 2020).

Embora existam diversos estudos evidenciando as propriedades microbiológicas dos OEs, as informações físico-químicas sobre a degradação térmica dessas substâncias são raras. O conhecimento destas características desempenha um papel indispensável no que se refere a produção, transporte, armazenamento e controle de qualidade. Nesse aspecto, técnicas como Termogravimetria (TG) e Análise Térmica Diferencial (DTA) são úteis para avaliar o ponto de ebulição, resíduos após vaporização e energia de ativação (GHODKI; GOSWAMI, 2016; LE et al., 2020).

De acordo com Le et al., (2020), a partir dos dados obtidos pela TG, a decomposição cinética dos OEs pode ser determinada com base no método isoconversional. Este método estabelece que a taxa de reação em uma constante de conversão, depende apenas da temperatura, sendo capaz de fornecer informações a respeito da presença de conteúdo não-volátil, que pode afetar negativamente as propriedades farmacológicas dos compostos bioativos dos OEs ao longo da degradação térmica (GARCIA; VALERIO, 2017). Dessa forma, a temperatura da taxa de isoconversão é usada para avaliar a energia de ativação (E_a) da

degradação do OE sem a necessidade de determinar o modelo da reação. Esse tipo de análise é primordial na etapa de produção dos OEs, visando determinar a estabilidade do produto e temperatura de volatilização.

Dentro do controle de qualidade, as técnicas térmicas citadas correspondem a uma parte essencial do tratamento direcionando a produção, armazenamento e distribuição dos OEs. Entretanto, os estudos envolvendo a análise dos OEs comerciais são raros, porém são capazes de fornecer informações a respeito da veracidade da ação desses produtos e os limites de temperatura a fim de evitar degradação de seus constituintes (LUIS et al., 2017). Assim, a relevância desta pesquisa consiste em fornecer informações para a comunidade científica no que se refere aos aspectos térmicos e microbiológicos dos OEs, visando uma melhor aplicabilidade destes produtos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antimicrobiana, citotóxica, assim como as características termoanalíticas de quatro óleos essenciais de origem comerciais.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar o potencial microbiológico dos (OEs) óleos essenciais por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida e Fungicida Mínima (CBM/CFM), e por meio do teste de susceptibilidade microbiana em difusão em ágar;
- b) Analisar os efeitos antimicrobianos em função do tempo de exposição aos OEs através da cinética de crescimento (*Curva time-kill*);
- c) Avaliar a citotoxicidade dos óleos essenciais sobre eritrócitos humanos utilizando o ensaio de hemólise;
- d) Caracterizar os OEs por meio de técnicas termoanalíticas.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Óleos essenciais

3.1.1 Histórico

O uso de plantas aromáticas que contém óleos voláteis tem sido aplicado desde o início da humanidade no preparo de alimentos e bebidas aromatizadas. Empiricamente, são usados para disfarçar odores desagradáveis, atrair indivíduos, contribuir para o bem-estar de humanos e animais através do controle de problemas de saúde evidenciando, assim, a relevância desses produtos para a cultura e economia mundial (ANDRADE et al., 2014).

O termo “óleo essencial” foi usado primeiramente por Paracelsus von Hohenheim no século XVI e, com o passar dos anos, o uso dessa substância passou a ser cada vez mais expandido, sendo utilizado desde o antigo Egito para prevenção e tratamento de doenças. Logo depois, passou a ser utilizado na aromaterapia e para melhoria da qualidade de vida da população (SHAABAN; EL-GHORAB; SHIBAMOTO, 2012).

No total, são conhecidos aproximadamente 3.000 OEs, dentre os quais, 300 são comercialmente importantes, principalmente para indústria de cosméticos e aromatizantes. Na área médica, apenas alguns OEs são utilizados, bem como na indústria alimentícia. Todavia, a vasta aplicabilidade terapêutica levou a um crescente aumento dos estudos voltados para as ações farmacológicas destes constituintes que se tornaram uma fonte segura de medicina natural (BÖHME et al., 2014). O Quadro 1 fornece informações gerais dos principais OEs comerciais, seus principais ativos e atividade biológica por eles desempenhada.

Quadro 1 – Principais OEs comerciais, seus componentes ativos e atividade biológica correspondente.

Planta/Espécie	Componente ativo	Atividade biológica
Hortelã (<i>Mentha piperita</i>)	Mentol, mentona	Antiviral, antioxidante
Lavanda (<i>Lavandula officinalis</i>)	Linalol, acetato de linalila	Antibacteriana, antiviral
Limão (<i>Citrus limonum</i>)	Limoneno	Antibacteriana, antiviral, antifúngica, antioxidante
Orégano (<i>Origanum vulgare</i>)	Carvacrol, timol, terpineno, cimeno.	Antibacteriana, antifúngica, antiviral, antioxidante
Eucalipto (<i>Eucalyptus globulus</i>)	1,8-cineol	Antibacteriana, antiviral

Fonte: Adaptado de BÖHME et al., 2014.

3.1.2 Definição, características físico-químicas e obtenção

Os óleos essenciais, também conhecidos como óleos voláteis, são classificados como produtos naturais concentrados, derivados de plantas que possuem em sua composição uma mistura de componentes em concentrações diferentes. Visualmente apresentam-se como líquido límpido, volátil, solúvel em solventes orgânicos, transparente (em sua grande maioria) e solúvel em lipídeos (ADORJAN; BUCHBAUER, 2010; CHOUHAN; SHARMA; GULERIA, 2017).

São definidos como metabólitos secundários de plantas, de forte odor, podendo ser encontrado no mercado como infusões, extratos e/ou comprimidos devido as propriedades terapêuticas apresentadas: ação digestiva, diurética, expectorante, sedativa, antifúngica e antimicrobiana (BAPTISTA-SILVA et al., 2020). Essas atividades se baseiam na presença de compostos únicos ou um grupo de compostos, principalmente os terpenóides, especialmente os monoterpenos (C10) e os sesquiterpenos (C15). Álcoois, aldeídos, ácidos, ésteres acíclicos,

hidrocarbonetos alifáticos, raros compostos nitrogenados, cumarinas e fenilpropanóides também podem estar presentes na composição destes produtos (NAZZARO et al., 2013).

A quantidade dos compostos ativos presentes nos OEs pode variar de acordo com as diferentes espécies, partes da planta, fatores geográficos e sazonais, podendo estar presente em qualquer parte da planta, incluindo folhas, caules, frutos, sementes, raízes ou casca. Geralmente, são armazenados em células, cavidades, tricomas glandulares, canais ou células epidérmicas de plantas que são encontradas, principalmente, em países de clima temperado ou quente (CHOUHAN; SHARMA; GULERIA, 2017; NAZZARO et al., 2013).

O processo de extração dos OEs de sua matriz natural é de extrema importância para o desempenho final das formulações oriundas dessas substâncias, uma vez que pode haver variação dos tipos e da quantidade/qualidade dos constituintes. Isso ocorre devido a diferenças encontradas no clima, composição do solo, idade e órgão da planta, entre outros. A extração pode ocorrer por meio de processos de hidrodestilação, destilação à vapor, destilação seca e prensagem mecânica a frio do epicarpo de frutas cítricas (BAPTISTA-SILVA et al., 2020).

Além destes, outros métodos físicos podem ser utilizados em conjunto com os métodos citados acima, como tratamento via ultrassom, radiação, extração de dióxido de carbono supercrítico e outros que foram desenvolvidos a fim de melhorar a extração dos compostos bioativos. Entretanto, mesmo com todas as melhorias nas técnicas de extração, o teor de OE extraído, não chega a ultrapassar 1% (RAO; CHEN; MCCLEMENTS, 2019; VOON; BHAT; RUSUL, 2012).

3.1.3 *Composição química*

Assim como a atividade sinérgica dos bicomponentes, a composição química pode interferir diretamente nos efeitos farmacológicos dos OEs, comprometendo assim sua ação final. Dessa forma, torna-se indispensável o estudo sobre os componentes dos OEs, visando estimar quais efeitos específicos e seu modo de ação (BAPTISTA-SILVA et al., 2020).

A composição química dos OEs é altamente diversificada, uma vez que possuem misturas complexas com diferentes componentes (tanto em relação à natureza, quanto à quantidade), sendo difícil descrever precisamente seu conteúdo. No geral, a atividade antimicrobiana dos OEs está diretamente relacionada com os componentes principais, ou seja, em maior quantidade na sua composição, bem como com a interação destes componentes com os outros constituintes em menor proporção (RAO; CHEN; MCCLEMENTS, 2019).

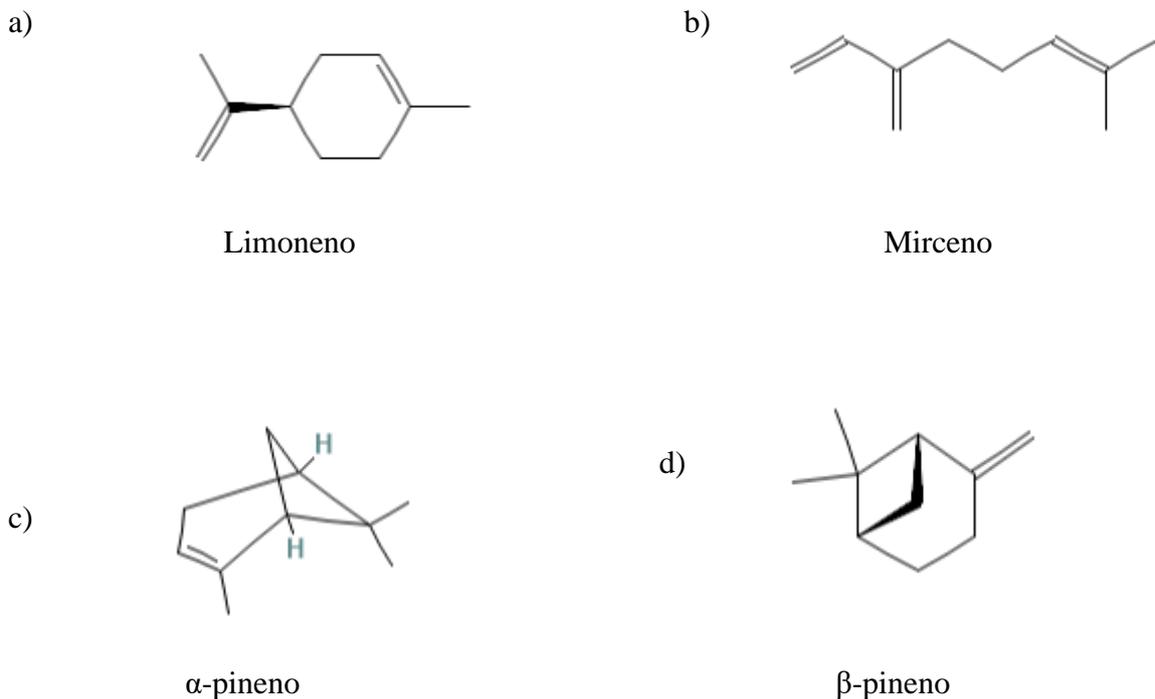
Terpenos

Os terpenos constituem um dos principais grupos de compostos contidos nos OEs, constituídos pela combinação de cinco bases de carbono (C5), denominadas isoprenos e terpenóides, que são terpenos oxigenados. Em geral, os terpenos são insolúveis em água e fornecem baixo sabor e aroma ao óleo, sendo facilmente decompostos pela luz e calor (BAPTISTA-SILVA et al., 2020).

Podem ser classificados com base no número de isoprenos na molécula (RAO; CHEN; MCCLEMENTS, 2019):

a) Monoterpenos: apresentam duas unidades de isoprenos, com fórmula $C_{10}H_{16}$. Os principais exemplos dessa classe são: limoneno, mirceno, α -pineno e β -pineno, representados na Figura 1:

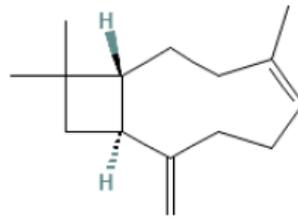
Figura 1- Monoterpenos. (a) limoneno (b) mirceno (c) α -pineno (d) β -pineno



Fonte: PubChem, 2022.

b) Sesquiterpenos: apresentam três unidades isopreno, com fórmula molecular $C_{15}H_{24}$. O β -cariofileno (Figura 2) é um exemplo desta classe sendo encontrado principalmente em OE de cravo, manjeriço, canela e alecrim.

Figura 2 - Exemplo de sequiterpenos: β -cariofileno



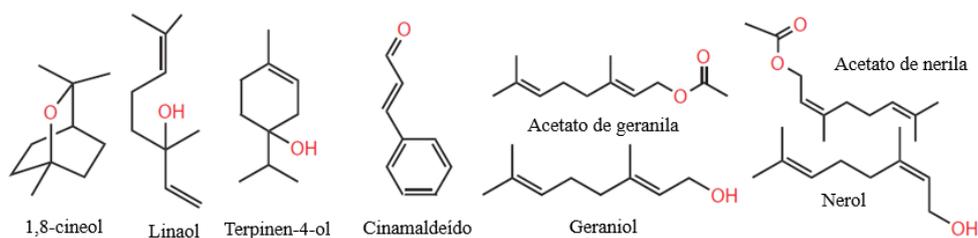
β -cariofileno

Fonte: PubChem, 2022.

Terpenoides

Assim como os terpenos, os terpenóides também são derivados de uma unidade isopreno. Entretanto, as unidades de isopreno dos terpenoides são estruturadas e modificadas de muitas maneiras: adição ou remoção de grupos metil e/ou adição de átomos de oxigênio. São classificados como monoterpenoides, sequiterpenoides ou diterpenoides, de acordo com o número de unidades isopreno. Como principais representantes desta classe, tem-se o 1,8-cineol, linalol, cânfora, acetato de geranila, acetato de nerila, geraniol (RAO; CHEN; MCCLEMENTS, 2019), representados na Figura 3.

Figura 3 - Estrutura química dos principais exemplos de terpenoides



Fonte: RAO; CHEN; MCCLEMENTS, 2019 (adaptado).

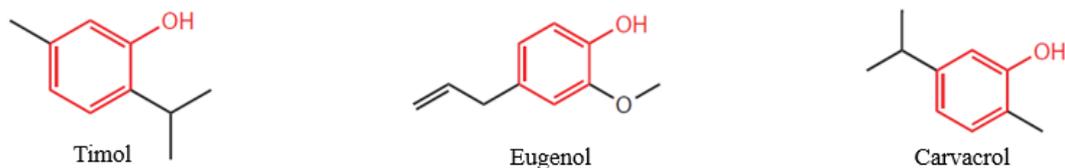
De acordo com Mastelic et al., (2005), os terpenoides expressam maior atividade antimicrobiana quando comparado com os terpenos. Como exemplo prático, tem-se a avaliação antibacteriana do óleo essencial de *Helichrysum italicum* com frações terpenos e terpenoides, em que a atividade antibacteriana foi maior na fração terpenoide do óleo. De maneira geral, os terpenóides que apresentam em sua estrutura álcool e aldeídos, apresentam atividade

antimicrobiana elevada quando comparado aos terpenoides que contém grupos carbonila (DORMAN; DEANS, 2000).

Fenóis

Também conhecidos como fenóis terpenóides, os fenóis representam um grupo de componentes químicos que contém um grupo hidroxila (-OH) ligado a um anel aromático (C6). Estudos mostram que estes compostos, quando encontrados em OEs, apresentam elevada atividade antimicrobiana que é atribuída, principalmente, a um grupo hidroxila livre e a presença de um sistema de transferência de elétrons (BEN ARFA et al., 2006; DORMAN; DEANS, 2000). Como exemplos de fenóis tem-se o timol, eugenol e carvacrol, encontrados no tomilho, cravo, canela, orégano e óleos (RAO; CHEN; MCCLEMENTS, 2019), representados na Figura 4.

Figura 4 - Estrutura química de fenóis



Fonte: RAO; CHEN; MCCLEMENTS, 2019 (adaptado)

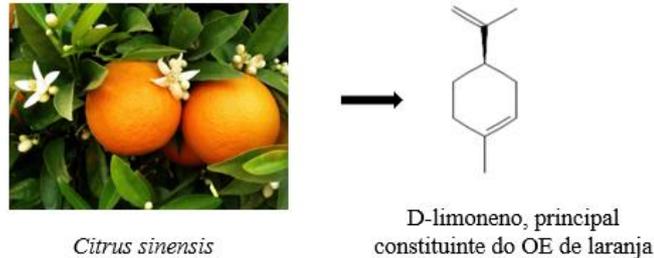
Apesar destes compostos isolados apresentarem, em sua grande maioria, atividade biológica, a interação dos componentes maiores e menores dos OEs podem resultar em atividade antimicrobiana sinérgica ou antagônica. De maneira geral, os OEs em sua composição íntegra, são capazes de exibir maior atividade antibacteriana do que os componentes principais isolados quando adicionados proporcionalmente, sugerindo assim, que os componentes menores nos OEs exercem uma função crítica de sinergismo para a obtenção da atividade antibacteriana esperada (RAO; CHEN; MCCLEMENTS, 2019).

3.1.4 Óleo essencial de lavanda (*Lavandula sp*)

Planta medicinal pertencente à família Lamiaceae, o gênero *Lavandula* é nativa na região do Mediterrâneo (França, Espanha, Itália), mas cultivada em diferentes partes do mundo,

decanal, segundo a análise realizada através da cromatografia gasosa (GC-MS) por Evangelho et al., (2019).

Figura 6 - *Citrus sinensis* e o principal constituinte do OE.



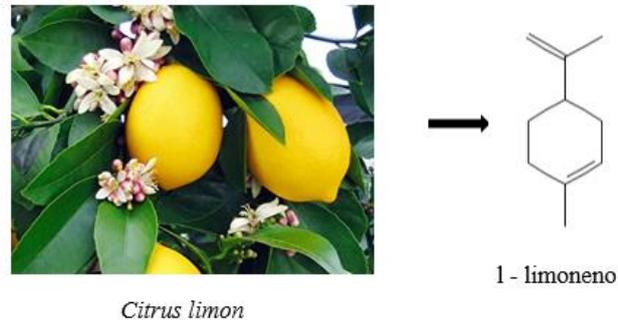
Fonte: PubChem, 2022 (Adaptado).

Além da atividade microbiológica, estudo recente realizado por Zhang et al., (2019) avaliou os efeitos antidepressivos inerentes a inalação do OE da *C. sinensis* em modelos animais. Ao final do estudo, os autores concluíram que o grupo exposto a inalação do OE obteve maior redução dos comportamentos depressivos enquanto o grupo tratado com fluoxetina não apresentou redução significativa dos sintomas. Também foi observado redução da hiperatividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) que, em casos de depressão maior, estão aumentados. Além disso, os níveis de serotonina, dopamina e norepinefrina foram restaurados significativamente no hipocampo e córtex pré-frontal dos modelos animais, sendo o d-limoneno o principal responsável por estes efeitos.

3.1.6 Óleo essencial de limão (*Citrus limon*)

O limão (*Citrus limon*) é uma fruta nativa da Ásia, classificada como uma das principais frutas cítricas depois da laranja e da tangerina. O OE extraído da casca do fruto é composto principalmente por l-limoneno (78,92%), α -pineno (5,08%), L- α -terpineol (4,61%) (Figura 7) e, em menor quantidade o β -mirceno (1,75%), β -pineno (1,47%) e β -linalol (0,95%) (NASSER AL-JABRI; HOSSAIN, 2014).

Figura 7 - Limão e o principal constituinte do OE, l-limoneno



Fonte: PubChem, 2022 (Adaptado).

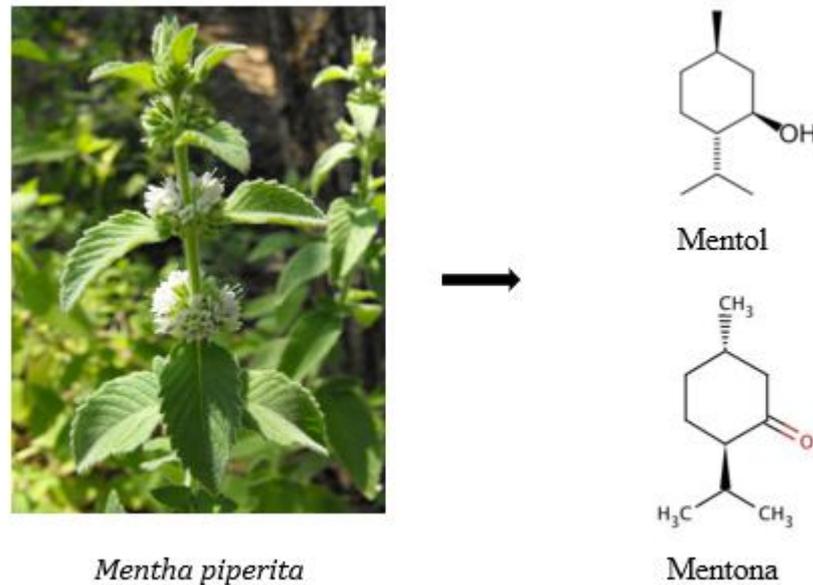
Segundo Paw et al., (2020), o *C. limon* apresenta potencial antioxidante e em alguns medicamentos o óleo de limão é usado como aromatizante e, devido a sua composição (flavonoides, terpenos, carotenos e cumarinas), possui atividade antimicrobiana, antidiabética, repelente de insetos, antimutagênicos e antivirais.

3.1.7 Óleo essencial de menta (*Mentha avarnsis* / *Mentha piperita*)

Mentha piperita L. (Figura 8) é uma planta medicinal amplamente distribuída na flora mundial, sendo bastante utilizada na fitoterapia por suas propriedades farmacológicas comprovadas como ação antibacteriana, antiproliferativa e antioxidante (ALEXA et al., 2018). O OE é extraído de partes aéreas da planta como as flores, folhas secas, planta inteira e planta com flores frescas, possuindo uma vasta aplicabilidade, podendo ser utilizado no alívio de sintomas de resfriados comuns, dor de cabeça, afecções da pele, sistema respiratório, sistema digestivo, sistema imune e neurológico (JEYAKUMAR; LAWRENCE; PAL, 2011).

A composição do óleo volátil apresenta como principais constituintes o mentol (29 a 48%), seguido da mentona (20 a 31%), mentofurano (6,8%) e acetato de mentila (3-10%). Os outros ingredientes contidos em menor quantidade são os carotenos, tocoferóis, ácido cafeico, flavonóides, tanínicos polifenóis polimerizados, betaína e colina (SINGH; SHUSHNI; BELKHEIR, 2015).

Figura 8 - *Mentha piperita* e os principais constituintes do seu óleo essencial



Fonte: PubChem, 2022 (Adaptado).

3.1.8 Atividade antimicrobiana dos OEs

Como citado anteriormente, o efeito antimicrobiano dos OEs é determinado por fatores como composição, grupos funcionais presentes nos componentes ativos e suas interações sinérgicas, não sendo exclusivamente dependente de um componente isolado, mas sim de uma cascata de reações envolvendo toda célula bacteriana. Além disso, a atividade antibacteriana dos OEs depende também do tipo de OE empregado e espécie testada (NAZZARO et al., 2013).

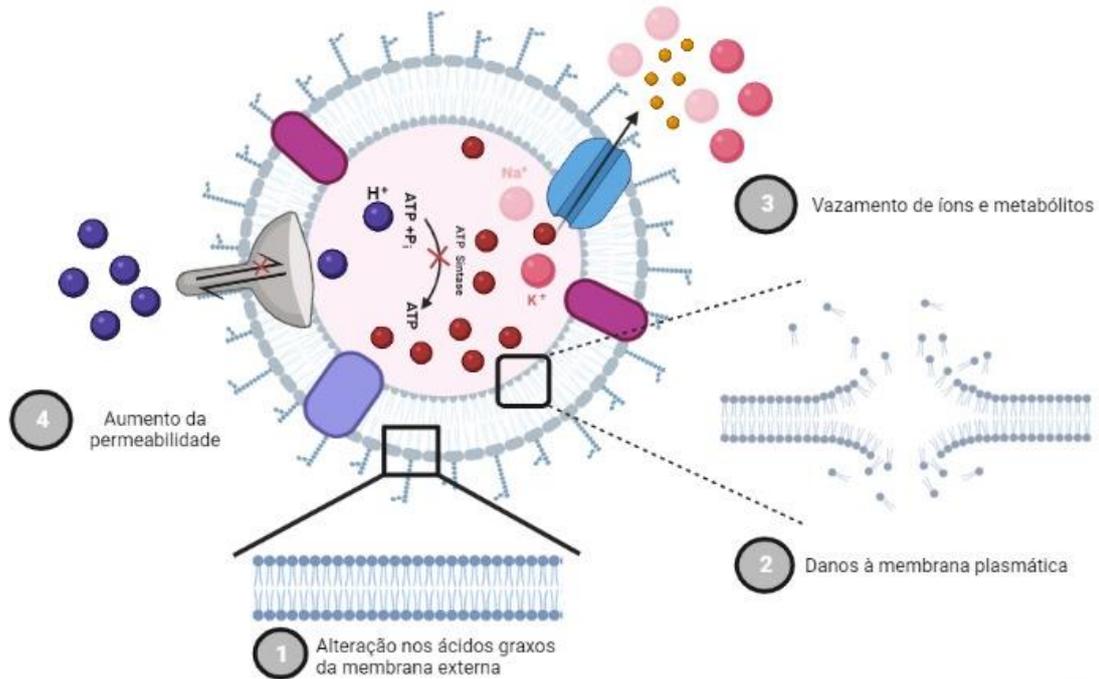
Quando comparada a susceptibilidade das bactérias Gram-negativas com as Gram-positivas, estas apresentam-se mais sensíveis, o que pode ser justificado pelo fato de as Gram-negativas possuírem uma membrana externa rígida, rica em lipopolissacarídeos, limitando a ação de compostos hidrofóbicos como os OEs. Já as Gram-positivas são cercadas por uma parede espessa de peptídeoglicano, pouco resistente à determinadas moléculas antimicrobianas, além de facilitar a interação de compostos hidrofóbicos devido a presença de extremidades lipofílicas (CHOUHAN; SHARMA; GULERIA, 2017).

Essa atividade antimicrobiana está diretamente relacionada com os componentes majoritários dos OEs e com a interação destes com os componentes de menor proporção. Os principais componentes que apresentam este tipo de atividade são os fenóis e os terpenóides

oxigenados, enquanto os terpenos, cetonas e ésteres possuem menor atividade (RAO; CHEN; MCCLEMENTS, 2019).

Quanto ao mecanismo de ação pelo qual os OEs exercem seu papel antibacteriano e fúngico, estudos recentes (SOLÓRZANO-SANTOS; MIRANDA-NOVALES, 2012) sugerem que a característica hidrofóbica destas substâncias é a principal responsável pela ruptura das estruturas bacterianas, podendo afetar tanto o envelope externo da célula quanto o citoplasma. Assim, os mecanismos de ação antimicrobiana dos OEs incluem a degradação citoplasmática, coagulação do citoplasma, danificação das proteínas de membrana, aumento da permeabilidade (provocando vazamento do líquido celular), redução da força motriz do próton, redução da síntese de ATP e redução do potencial de membrana através do aumento da permeabilidade de membrana, como representado na Figura 9 (TRIFAN et al., 2020).

Figura 9 - Principais mecanismos de ação dos OEs na célula bacteriana



Fonte: Acervo próprio.

Com a alteração na membrana citoplasmática e os defeitos no transporte de moléculas e íons provocada pelo OEs ocorre um desequilíbrio na célula bacteriana, levando a uma série de eventos como coagulação do citoplasma, desnaturação de enzimas, proteínas e perda de íons. Como resposta, a célula bacteriana passa a expressar maior quantidade de proteínas para reparar o dano provocado. Entretanto, a depender da concentração de OE, essa resposta pode não ser suficiente, ocasionando a morte celular (NAZZARO et al., 2013).

Segundo Rao, Chen, McClements (2019), determinados constituintes possuem mecanismos específicos como os fenóis, que agem como transportadores de prótons, reduzindo o gradiente de pH da membrana citoplasmática, levando à morte celular. Os terpenos exercem atividade antimicrobiana a partir da inibição da atividade respiratória e outros processos energéticos que ocorrem na membrana celular. Já os terpenóides, por sua vez, provocam uma perturbação na composição dos ácidos graxos da membrana celular bacteriana, resultando em alterações na permeabilidade da membrana.

Além da atividade antibacteriana, os OEs também apresentam atividade contra determinadas espécies de fungos, através do bloqueio da comunicação celular, atenuando o crescimento de fungos e inibindo a produção de micotoxinas. Os principais constituintes responsáveis por essa ação os são terpenos, eugenol, farnesol, benzoquinona, mentol e mentona

que apresentam atividade principalmente contra *C. albicans*, *C. glabrata*, e outras. De forma geral, os OEs são capazes de interromper a síntese da quitina na parede celular dos fungos, provocando alterações severas na síntese de glicoproteínas, estrutura mitocondrial e na inibição da esporulação (ALJAAFARI et al., 2021; SHAABAN; EL-GHORAB; SHIBAMOTO, 2012).

3.1.9 Avaliação da atividade antimicrobiana dos OEs

Para avaliação da atividade antimicrobiana dos OEs, várias metodologias podem ser aplicadas, objetivando mensurar a interação dos constituintes dos OEs com as espécies bacterianas. Dentre os mais utilizados encontram-se o ensaio *checkboard*, *time-kill* e os métodos que avaliam a influência de produtos naturais na Concentração Inibitória Mínima (CIM), que pode ser determinada por meio de teste de difusão em ágar como também por meio de diluições em meios de crescimento (TRIFAN et al., 2020; VAN DE VEL; SAMPERS; RAES, 2019).

3.1.9.1 Difusão em ágar

O método de difusão em ágar é uma abordagem bem estabelecida para rastrear a eficácia de OEs frente a espécies bacterianas, fornecendo informações em formas de zonas de inibição, avaliando-se o tamanho do halo formado. É considerado um método simples, de baixo custo, capaz de avaliar várias cepas bacterianas ao mesmo tempo. Por outro lado, não é indicado para análise quantitativas da eficácia antimicrobiana dos OEs, sendo necessário a combinação com outros testes como o método de diluição (VAN DE VEL; SAMPERS; RAES, 2019; PEREIRA et al., 2022).

Em resumo, o teste é realizado a partir do espalhamento de ágar em uma placa com um inóculo padronizado de determinada espécie bacteriana e, em seguida, um disco de aproximadamente 6 mm contendo um agente microbiano é colocado e a placa é encubada por tempo pré-determinado. A eficácia antimicrobiana é observada visualmente, medindo-se a área de inibição formada, podendo ser classificada em alta inibição (zona de inibição ≥ 20 mm), inibição moderada/leve (inibição entre 12 e 20 mm) e sem inibição (inibição > 12 mm) (RAO; CHEN; MCCLEMENTS, 2019).

3.1.9.2 Método de diluição

O método de diluição é responsável por determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM), definida como a menor concentração de um agente antimicrobiano capaz de inibir o crescimento bacteriano (efeito bacteriostático) de um microrganismo em um determinado espaço de tempo com condições específicas. Além disso, é possível determinar a Concentração Bactericida/Fungicida Mínima (CBM/CFM) que corresponde a concentração mais baixa em que as bactérias não crescem no meio devido a morte celular provocada pela substância testada (efeito bactericida) (VAN DE VEL; SAMPERS; RAES, 2019; PAUW; ELLOF, 2014; ELLOF, 1999; PEREIRA et al., 2022).

O princípio geral do teste é que a cepa bacteriana seja adicionada a uma série de diluições contendo a substância teste em um meio de cultura (ágar ou caldo) para, então, determinar a presença ou ausência de crescimento bacteriano. O valor da CIM é determinado ao final do período de incubação e é afetado por diversos fatores como condições de inóculo, tamanho, tipo de crescimento, método de preparações dos OEs, o que justifica a diferença considerável dos valores de CIM comumente encontrados na literatura (RAO; CHEN; MCCLEMENTS, 2019).

3.1.9.3 Time-kill

O método time-kill é utilizado para avaliar o efeito antimicrobiano dos OEs em função do tempo, sendo aplicado após a determinação da CIM com método de diluição. De forma geral, o teste é realizado a partir de um inóculo de concentração entre 10^6 e 10^9 CFU/mL. Depois de um certo tempo de incubação (24 ou 36 h), as curvas de morte são estabelecidas a partir da monitorização de células sobreviventes em cada intervalo de tempo (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016).

3.2 Análise Térmica

Avaliação da degradação térmica de polímeros é um tópico bastante relevante, uma vez que a sensibilidade a determinadas temperaturas podem provocar degradação dos constituintes do produto analisado, resultando em perda total ou parcial de sua atividade (BALART et al., 2019). Os componentes dos OEs podem converter-se entre si através de reações de oxidação, isomerização, ciclização ou desidrogenação, devido a sua relação estrutural e sua estabilidade

pode ser alterada na presença de luz, liquefação, gases atmosféricos, e, principalmente, temperatura, podendo provocar alterações na cor, sabor e odor destes produtos. Por essa razão, a análise de sua degradação térmica durante a etapa de pré-formulação é indispensável (CHAAR et al., 2004; SOLTANBEIGI, 2020).

Uma das principais técnicas termoanalíticas úteis na investigação da perda de massa de uma amostra em função do tempo ou da temperatura é a Termogravimetria (TG), Termogravimetria Derivada (DTG) e Análise Térmica Diferencial (DTA). A temperatura de decomposição é representada pelas inclinações máximas de cada estágio de perda de massa registrada na curva termogravimétrica e vista como um pico na derivada termogravimétrica. Esta técnica é bastante utilizada para caracterizar a estabilidade térmica de OE como o de laranja, manjerição e também para avaliar a energia de ativação envolvida na volatilização de OE de lavanda, eucalipto, *tea tree* e outros (CHAAR et al., 2004).

As técnicas de DSC, TG e DTA são capazes de avaliar propriedades físico-químicas como volume, peso, capacidade térmica, a partir do aumento da temperatura do sistema em que a amostra está inserida que é aumentada em razões de aquecimento pré-estabelecidas. Assim, é possível determinar a cinética envolvida no processo de decomposição, realizando um número padrão de curvas em diferentes razões de aquecimento. As diferentes vias de decomposição possuem diferentes métodos para calcular os parâmetros cinéticos das reações térmicas tomando como base a Lei da Velocidade de Arrhenius. Essa variação da decomposição pode ser detectada por métodos isoconversionais, conhecidos por conseguirem determinar energias de ativação em função da extensão da conversão, fornecendo informações confiáveis a respeito deste processo (BROWN et al., 2000; OZAWA, 2000; KISSINGER 1957).

Os métodos isoconversionais são métodos considerados bem fundamentados para descrever de maneira simples as várias etapas que ocorrem na degradação cinética. Em geral, a análise térmica modelo-independente tem como principal objetivo investigar os mecanismos de decomposição, a partir de técnicas termogravimétricas, além obter evidências da dinâmica de decomposição cinética, utilizando modelos cinéticos isoconversionais independentes de modelo (RAI et al., 2017).

3.2.1 Cinética de degradação térmica

Com os resultados obtidos a partir da análise da cinética de degradação térmica, é possível determinar também os mecanismos da reação de decomposição além dos parâmetros que podem ser determinados pela equação de Arrhenius (fator de reação, energia de ativação e

ordem de reação). Os dados termocinéticos correspondentes a decomposição da reação podem ser determinados por parâmetros como o tripleto cinético ou comportamento térmico de substâncias ativas e/ou seus constituintes. Esses dados são determinados a partir de métodos isoconversionais não isotérmicos: Friedman, Kissinger–Akahira–Sunose e Flynn–Wall–Ozawa que objetivam mensurar a temperatura correspondente aos valores fixos de α em experimentos com razões de aquecimento variadas (COSTA et al., 2021).

Kissinger–Akahira–Sunose (KAS)

O método KAS consiste em um modelo integral isoconversional, utilizado para determinação da energia de ativação de um ponto máximo de temperatura (T). É expresso pela seguinte Equação (1):

$$\ln = \frac{\beta}{T^2} = \ln \frac{AR}{Eg(x)} - \frac{E}{RT} \quad \text{Equação (1)}$$

A energia de ativação pode ser obtida a partir da inclinação da reta obtida ao plotar $\ln(\beta/T^2)$ versus $1/T$ (COSTA et al., 2021).

Flynn–Wall–Ozawa (FWO)

No método FWO também é possível calcular a energia de ativação (E_a) sem informações do mecanismo da reação e baseia-se na seguinte Equação (2):

$$\log \beta = \log \frac{AE_a}{Rg(\alpha)} - 2.315 - 0.4567 \frac{E_a}{RT} \quad \text{Equação (2)}$$

A energia de ativação é obtida pela inclinação das retas obtidas pelo gráfico $\log \beta$ versus $1/T$ (SOKOTO et al., 2016).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Delineamento do estudo

Trata-se de uma pesquisa aplicada, quantitativa do tipo experimental, *in vitro*, realizada no Laboratório de Ensaio e Desenvolvimento de Medicamentos (LABDEM) na Universidade Estadual da Paraíba.

4.1.2 Obtenção dos óleos essenciais

Os OE analisados foram obtidos de uma empresa de cosméticos nacional (Bayonne Cosméticos LTDA, Curitiba, Paraná) e estão descritos no Quadro 2 a seguir:

Quadro 2 – Descrição dos OE utilizados no estudo.

Nome popular	Nome científico	Lote	Identificação no texto
OE de lavanda	<i>Lavandula hybrida</i>	03440219	OE-01
OE de laranja	Casca da <i>Citrus sinensis</i>	01620119	OE-02
OE de limão	Casca da <i>Citrus limon</i>	00790119	OE-03
OE de menta	<i>Mentha avernsis</i> / <i>Mentha piperita</i>	00750119	OE-04

Fonte: Acervo próprio.

4.1.3 Linhagens bacterianas e cepa fúngica

Foram utilizadas cepas padrões da American Type Culture Collection (ATCC): *Staphylococcus aureus* (ATCC 17193), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), e *Candida albicans* (ATCC 10231).

4.2 Métodos

4.2.1 Avaliação da atividade antimicrobiana

4.2.1.1 Teste de verificação da atividade antibacteriana e antifúngica *mínima* (CIM) dos OE pelo método de microdiluição

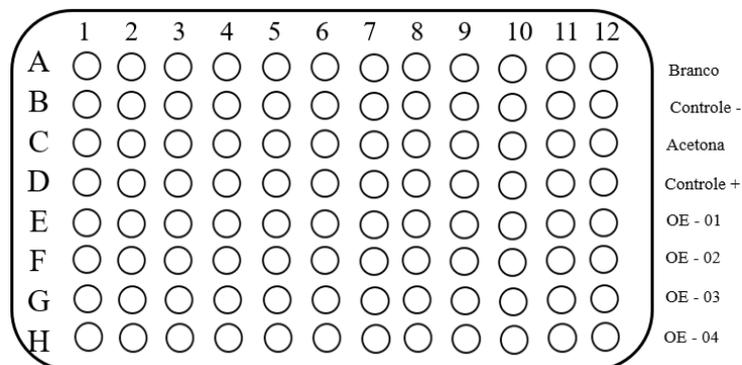
A sensibilidade das linhagens microbianas frente aos OEs foi determinada de acordo com o protocolo realizado por Pauw; Ellof (2014) a partir do método de microdiluição em caldo. As cepas de *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* foram inoculadas em caldo tripton de soja (TSB) por 24h. *C. albicans* foi inoculada em Caldo *sabouraud dextrose* por 48h. A padronização foi feita em espectrofotômetro (Bioespectro Modelo: SP22) em 580 nm, ajustando o inóculo à 25% de transmitância, que corresponde a aproximadamente 1×10^6 UFC/mL para todas as cepas.

O inóculo bacteriano foi padronizado em espectrofotômetro com comprimento de onda de 625nm e absorbância entre 0,08 - 0,1. Após diluições sucessivas, obteve-se inóculo para teste com concentração de 1×10^6 UFC/mL (CLSI, 2005).

O inóculo fúngico foi padronizado em espectrofotômetro com comprimento de onda de 530nm e absorbância entre 0,08 - 0,1. Após diluições sucessivas, obteve-se inóculo para teste com concentração de 5×10^3 UFC/mL (CLSI, 2008).

Foram utilizadas microplacas de 96 poços estéreis com fundo chato, dispostas como na Figura 10 a seguir:

Figura 10 - Esquema de microdiluição em placa de 96 poços



Fonte: Acervo próprio.

Notas: Branco - Água destilada estéril (ADE)

Controle + (controle positivo) - Contendo ADE + antimicrobiano

Controle - (controle negativo) - Caldo TSB

E-01, E-02, E-03, E-04 - Amostras testadas

Primeiramente, pipetou-se 100 μL de água destilada estéril em todos os poços. Nos poços A1 e B1 (controle negativo), foram adicionados 100 μL de caldo TSB. Em C1, foram adicionados 100 μL de acetona, solvente utilizado para solubilização dos OEs, diluídos previamente em eppendorf.

Como controle positivo, foi usado cefazolina para as linhagens bacterianas e, para a cepa fúngica, nistatina, na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$ para ambos. No poço D1, pipetou-se 100 μL do respectivo controle positivo para o tipo de cepa testada. Dos poços E1 até H1 foram pipetados 100 μL de cada OE conforme representados na Figura 10. Para que estes óleos solubilizassem adequadamente nos respectivos poços, foi necessário realizar uma mistura com acetona antes da microdiluição nas placas, obtendo-se concentração final de 32 mg/mL . Em seguida, foram realizadas as diluições sucessivas 1:1, homogeneizando e transferindo-se 100 μL do primeiro poço para os poços subsequentes até o final. Por fim, foi adicionado 100 μL do inóculo padronizado previamente, com exceção da linha A de maneira que, ao final, o volume em cada poço foi de 200 μL . As concentrações finais dos OE testados em cada linha foram de 8 até menos de 0,031 $\mu\text{g/mL}$ como apresentado na Tabela 1. Os testes foram realizados em triplicatas em dias alternados.

Tabela 1 – Distribuição da concentração da amostra e seus respectivos microrganismos

AMOSTRA	Ordem decrescente de concentração em mg/mL (\rightarrow)											
	POÇOS											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
E-01	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125...			
E-02	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125...			
E-03	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125...			
E-04	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125...			

Fonte: Acervo próprio.

A microplaca foi encubada em estufa a $35^{\circ}\text{C} \pm 1$ por 24 h para bactérias e, para fungos, $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ por 48 horas. Esta metodologia foi repetida para todas as cepas mencionadas no estudo em duplicata. Para leitura, utilizou-se 20 μL de resazurina (100 mg/mL) em cada poço. As placas permaneceram em repouso por, no mínimo, 1 hora e, em seguida, foi realizada a

leitura visual em que a cor rosa clara indicou crescimento bacteriano e a cor violeta/roxo indicou inibição do crescimento.

4.2.1.2 Determinação da concentração bactericida e fungicida mínima (CBM/CFM)

A CBM e a CFM foram realizadas em todos os poços que apresentaram inibição na microplaca. Para cada poço, foi realizada uma subcultura transferindo-se por meio de hastes esterilizadas, material de cada poço para uma placa de Petri contendo Ágar *Muller Hinton*. As placas foram incubadas em estufa a $37\text{ °C} \pm 1$ por 24 horas para bactérias. Para *C. albicans*, o ágar utilizado foi o *Sabouraud Dextrose*, com temperatura de incubação em aproximadamente $25\text{ °C} \pm 1$ por 48 horas. A CBM e a CFM foram definidas como a menor concentração que apresentou inibição do crescimento. A leitura foi realizada visualmente após o tempo de incubação necessário.

4.2.1.3 Método de difusão em ágar

O teste de difusão em ágar foi feito em duplicata, com base na metodologia descrita por Silva et al., (2012), em que o preparo do inóculo se deu como descrito anteriormente, utilizando uma alíquota de 1 mL adicionada à 5 mL (1% v/v) do ágar superfície, utilizando-se o ágar Muller Hinton para bactérias e o sabouraud dextrose para o fungo.

Para o meio base foram preparadas placas de Petri contendo ágar Muller Hinton. Depois de solidificados, foram adicionados a placa quatro templates de aço inoxidável, aplicando-se 100 µL dos OEs essenciais puros. Os óleos foram dispostos em uma placa de Petri contendo templates de aço inoxidável com os antibióticos: cefazolina para *S. aureus* e *E. coli*, ciprofloxacino para *P. aeruginosa* e, para os fungos, nistatina, na concentração de 200 µg/mL. As placas foram incubadas por 24 h à $35\text{ °C} \pm 1$ para bactérias e por 48 h à $25\text{ °C} \pm 1$ para fungos. Por fim, as medidas dos halos de inibição foram feitas com paquímetro digital e expressas em mm.

4.2.2 Avaliação da citotoxicidade *in vitro* pelo ensaio de atividade hemolítica

O ensaio de citotoxicidade *in vitro* foi realizado através do ensaio da atividade hemolítica (BRANDÃO, 2014). Inicialmente preparou-se uma suspensão de 4% de hemácias em solução salina 0,9%, obtidos a partir de doação de sangue humano (tipo AB+). Uma alíquota de 1 mL

desta solução foi adicionada à 1 mL de cada uma das amostras. Após uma hora em repouso à 37 °C, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm, durante 10 minutos e analisadas em espectrofotômetro em 540 nm, tendo como branco uma solução salina à 5%.

4.2.3 Efeitos dos OEs nas curvas de tempo de morte bacteriana (*time-kill*)

As curvas de tempo de morte foram usadas para testar a atividade bactericida dos OEs de lavanda, laranja e menta contra *S. aureus* ATCC 25923, realizado conforme descrito por Mogana et al (2020) com algumas modificações. As curvas de tempo de morte foram determinadas usando concentrações diferentes dos OEs 01, 02 e 04: CIM \times 1, $\frac{1}{2}$ CIM, $\frac{1}{4}$ CIM e $\frac{1}{8}$ CIM, bem como a cefazolina na concentração de 200 $\mu\text{m/mL}$, usada como controle positivo 1×10^6 . O OE-03 não foi utilizado para o teste devido a baixa concentração de CIM para a cepa de *S. aureus*.

S. aureus foi inoculado em ágar Muller Hinton e incubado a 37°C por 24 h. A padronização do inóculo foi feita em espectrofotômetro (Bioespectro Modelo: SP22) em 580 nm, ajustando o inóculo à 25% de transmitância, que corresponde a aproximadamente 1×10^6 UFC/mL como concentração final (inóculo de trabalho). Em seguida, foi preparada uma solução mãe (SM) dos OEs para solubilização dos mesmos com acetona, composta por 1,37 mL de acetona + 40 μL de cada uma dos OEs. Dessa solução, foram preparadas as soluções de trabalho para cada OE tomando como base as respectivas CIM encontrada no teste de microdiluição. De cada solução de trabalho, preparou-se 6 eppendorf correspondente aos tempos pré-determinados: 0, 1, 3, 6, 12 e 24h, contendo 100 μL da solução de trabalho + 100 μL do inóculo de trabalho. Os tubos foram mantidos em incubação a 37°C por 24 horas e as alíquotas foram retiradas após 1, 3, 6, 12 e 24 horas de incubação e semeadas em ágar MH por meio de 10 gotas contendo 10 μL espalhadas pela placa.

4.2.4 Análise Térmica Diferencial (DTA) e Termogravimetria (TG)

As curvas térmicas (TG e DTA) foram obtidas em um analisador térmico simultâneo, modelo DTG-60 da marca Shimadzu, utilizando cadinhos de alumina com amostras padronizadas em $5 \pm 0,5$ mg, sob uma atmosfera de nitrogênio (N_2), com vazão de 50 mL min^{-1} . Os experimentos foram realizados entre as temperaturas de 25 e 400 °C com razão de aquecimento de 5, 10 e 20 °C min^{-1} . O equipamento foi calibrado com oxalato de cálcio monohidratado. Os dados foram analisados usando o software TASYs da Shimadzu.

4.2.5 *Degradação cinética não-isotérmica*

O estudo de cinética foi realizado através dos dados obtidos da análise Termogravimétrica (TG) em razões de aquecimento iguais a 5, 10 e 20 °C min⁻¹, sob atmosfera de nitrogênio. Cada amostra foi padronizada em 5,0 ± 0,5 mg em um cadinho de platina, com faixa de temperatura entre 25 e 600 °C.

De acordo com Lee et al., (2020) no método isoconversional de análise dos dados obtidos por TG, a taxa de reação em uma conversão depende apenas da temperatura, que pode ser usada para avaliar a energia de ativação (E_a) da degradação do óleo essencial. No presente estudo, para a determinação da cinética de degradação do OE foram utilizados os modelos de Flynn–Wall–Ozawa (FWO) e Kissinger–Akahira–Sunose (KAS) que envolvem a determinação das temperaturas correspondentes aos valores fixos de α em diferentes razões de aquecimento.

4.3 **Análise Estatística**

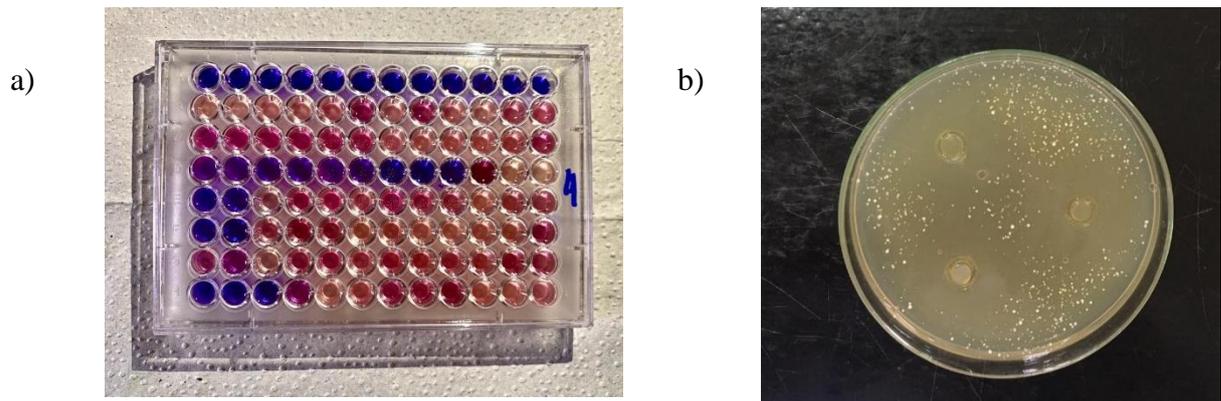
Os resultados obtidos foram expressos como média ± desvio padrão (d.p.) para o teste de difusão em ágar, utilizando o Excel® 2020.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da Atividade antimicrobiana

Dentre os testes para avaliação antimicrobiana de OEs existentes, a técnica de microdiluição em caldo é a mais comumente utilizada para avaliação da atividade antimicrobiana de substâncias, uma vez que permite avaliar a atividade bacteriostática e bactericida do produto em questão. Até o presente momento não existe uma padronização internacional para classificar os valores de CIM encontrados como satisfatórios ou não (FERNANDES, 2017). Na Figura 11 encontram-se as técnicas microbiológicas utilizadas: microdiluição em caldo e difusão em ágar. Os dados encontrados no ensaio de microdiluição em caldo estão descritos na Tabela 2.

Figura 11 - Ensaio da atividade antibacteriana (a) técnica de microdiluição em caldo e (b) difusão em ágar



Fonte: Acervo próprio.

Tabela 2 – Determinação da concentração inibitória mínima, bactericida e fungicida para os OEs testados

Substâncias testadas	Microrganismos CIM/CBM (mg/mL)							
	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>C. albicans</i>	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CFM
OE - 01 (Lavanda)	4,00	0,00	0,00	0,00	2,00	0,00	2,00	4,00
OE - 02 (Laranja)	4,00	4,00	0,00	0,00	2,00	0,00	0,25	0,00
OE- 03 (Limão)	0,00	0,00	0,00	0,00	2,00	0,00	1,00	0,00
OE - 04 (Menta)	2,00	8,00	0,00	0,00	2,00	0,00	1,00	1,00
Cefazolina ¹	0,31	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	-	-
Nistatina ²	-	-	-	-	-	-	0,25	0,00

Fonte: Acervo próprio.

Notas: ¹ e ² = padrões utilizados.

No teste de microdiluição em caldo, considerando as concentrações determinadas para avaliação da atividade antibacteriana de 0,25 a 8,00 mg/mL, apenas a *E. coli* não apresentou inibição do crescimento pelos OEs testados.

Quanto a CBM, foi possível determiná-la apenas na cepa de *S. aureus* para o OE-02 (laranja) e OE-04 (menta) com valor de 4,00 e 8,00 mg/mL, respectivamente. Já para a *C. albicans*, a CFM foi observada nos OE-01 (lavanda) e OE-03 (limão), com valor de 4,00 e 1,00 mg/mL, respectivamente. Assim, o microrganismo que apresentou maior sensibilidade para o OE-03 (limão) foi a *C. albicans* e, para o OE- 02 (lavanda), o *S. aureus*. Já para a *E. coli* e *P. aeruginosa* não foi possível determinar a concentração bactericida mínima.

O controle, realizado com cefazolina a 200 µg/mL apresentou resultados satisfatórios com CIM entre 0,41 e 4,00 mg/mL para as cepas bacterianas e, para a *C. albicans* a nistatina apresentou CIM de 0,25 mg/mL. O controle de viabilidade tanto das bactérias quanto do fungo foi satisfatório, assegurando o crescimento durante a realização dos experimentos. Não foi observado crescimento de microrganismos no controle de esterilidade realizado nem com o diluente utilizado (acetona).

No teste de difusão em ágar, representado na Tabela 3, todos os óleos testados apresentaram atividade contra as cepas de *S. aureus* e *E. coli*, com tamanho dos halos variando de 6,00 a 28,80 mm. Na cepa de *P. aeruginosa* apenas o OE-01 e o OE-03 apresentaram inibição

com halos que variam de 6,40 a 9,60 mm, enquanto os OE – 02 e OE – 04 não inibiram o crescimento desta espécie. Na cepa de *C. albicans* foi possível observar inibição em todos os OEs com exceção do OE-04 que não apresentou atividade.

Assim, *C. albicans* foi a cepa que apresentou maior sensibilidade frente aos OEs, principalmente com o OE-02 em que o CIM foi igual a CIM do padrão escolhido (nistatina). De acordo com Serra et al., (2017) devido à natureza lipofílica dos OEs, estes se ligam com a membrana celular dos fungos inibindo a síntese de ergosterol, alterando a morfologia da parede celular, inibindo enzimas envolvidas na síntese celular, alterando a permeabilidade de membrana e produzindo espécies reativas de oxigênio.

Tabela 3 – Tamanho em milímetros dos halos encontrados no teste de difusão em ágar

Espécie	Média do halo de inibição (mm) / DP*				
	OE - 01	OE - 02	OE - 03	OE - 04	Padrão/DP*
<i>S. aureus</i>	12,30 ± 0,85	28,3 ± 6,01	19,6 ± 1,19	11,20 ± 2,49	25,00 ± 0,81 ¹
<i>E. coli</i>	11,50 ± 1,93	26,4 ± 2,00	6,40 ± 0,52	8,90 ± 0,14	20,5 ± 0,45 ¹
<i>P. aeruginosa</i>	9,66 ± 0,18	0,00 ± 0,00	7,73 ± 0,99	0,00 ± 0,00	31,2 ± 0,15 ²
<i>C. albicans</i>	10,00 ± 0,00	19,00 ± 0,00	12,60 ± 0,94	0,00 ± 0,00	20,4 ± 0,00 ³

Fonte: Acervo próprio.

Notas: *Desvio Padrão. ¹Padrão com cefazolina. ²Padrão com ciprofloxacino. ³Padrão com nistatina.

Dentre as cepas bacterianas testadas, *S. aureus* foi a que demonstrou maior sensibilidade frente aos OEs testados. Essa observação também foi constatada por Jeyakumar et al., (2011) que, ao testar o óleo de *M. piperita* em cepas Gram-negativas e Gram-positivas pelo método de microdiluição em caldo, notaram maior susceptibilidade nas bactérias Gram-positivas. Da mesma forma, Garzoli et al., (2019) ao determinar a CIM e realizar o teste de difusão em ágar da *L. x intermedia* observaram que, das cepas testadas, o grupo das Gram-positivas foi o que demonstrou maior tamanho de halo com valores entre 14,50 e 21,50 mm tendo o halo de 28,50 mm da gentamicina como padrão no teste de difusão em ágar.

De acordo com Chouhan, Sharma, Guleria (2017), isso ocorre porque estes microrganismos possuem uma parede celular menos rígida, além de estarem rodeados de uma parede espessa de peptidoglicano pouco densa, o que favorece a entrada de pequenas moléculas antimicrobianas até a membrana celular. Os principais constituintes envolvidos nessa atividade, segundo Alfaajari et al., (2021), são os compostos fenólicos como eugenol, carvacrol e timol.

Ao analisar os dados obtidos na microdiluição em caldo e difusão em ágar com *E. coli* foi possível observar uma disparidade expressiva. No primeiro teste (Tabela 2), *E. coli* não apresentou sensibilidade a nenhum dos OEs testados. Todavia, no teste de difusão em ágar (Tabela 3), apenas o OE – 03 não apresentou halo de inibição, sendo o OE - 02 o que apresentou maior inibição para esta cepa, com halo de 26,4 mm.

Segundo Jeyakumar et al., (2011), diferenças podem ser observadas ao se comparar o teste de microdiluição em caldo com o teste de difusão em ágar. Isso pode ocorrer devido a diversos fatores que incluem diferenças no crescimento bacteriano, tipos de microrganismos utilizados, solubilidade do óleo e de seus componentes. Além disso, a diferença na concentração dos OEs utilizados nos testes e suas respectivas composições podem ser responsáveis pela diferença observada entre os resultados encontrados na presente análise. Essa disparidade é comumente relatada nos estudos que envolvem determinação do CIM de OEs. Segundo Aljaafari et al., (2021), o principal problema está na execução do teste que difere dos testes realizados com substâncias sólidas, por exemplo, uma vez que os OEs sofrem fácil evaporação.

O OE-01 apresentou maior atividade frente as cepas de *C. albicans* com CIM de 2,00 mg/mL e CBM de 4,00 mg/mL. No teste de difusão em ágar também demonstrou inibição com halo de 10,00 mm (Tabelas 2 e 3). Na determinação do CIM através da técnica de microdiluição, Adaszynska-Skwirzynska e Dzieciol (2020) também observaram inibição das cepas de *C. albicans* dos óleos essenciais das flores e do caule da *Lavandula angustifolia* com valores de CIM entre 0,125 e 0,625% (v/v).

O resultado observado no teste de difusão em ágar do OE-01 nas cepas de *E. coli* (tamanho do halo = 11,56 mm) corrobora com o resultado encontrado por Garzoli et al., (2019) que realizou o mesmo teste de disco difusão com óleo essencial obtido da *Lavandula x intermedia* que obteve zona de inibição de $13,00 \pm 1,00$ mm. Dessa forma é possível inferir que, apesar de apresentarem composição, modos de extração e espécies diferentes, o OE de lavanda apresenta atividade antimicrobiana satisfatória no teste de difusão em ágar, tomando como base o padrão testado.

Assim, ao analisar a Tabela 2 e 3 é possível inferir que o OE – 02 demonstrou menor inibição de crescimento dentre os OEs testados, apresentando CIM de 0,25 mg/mL para *C. albicans*, valor igual ao encontrado no padrão testado. Na difusão em ágar, as zonas de inibição formadas pelo OE – 02 foram uma das melhores, já que apresentaram tamanho maior do que os padrões testados no caso das cepas de *S. aureus* e *E. coli*, sendo 28,30 e 26,40 mm respectivamente, enquanto o halo formado pelo padrão (cefazolina) foi de 25,00 e 20,50, respectivamente. Adicionalmente, *C. albicans* também apresentou formação de halo com

tamanho de 19,00 mm, bem próximo do tamanho do halo (20,40mm) formado pelo padrão testado (nistatina). Esta atividade também foi constatada por Sehatta et al., (2021) que obtiveram zona de inibição mais altas ($18,50 \pm 1,01$ mm) tanto para *S. aureus* como para *E. coli* no teste de disco difusão realizado com OE da *Citrus sinensis* (laranja).

Essa atividade antimicrobiana observada no OE – O2 é atribuída, principalmente a um de seus principais constituintes, o limoneno que compõem cerca de 70 a 80% da composição do óleo (ELGAT et al., 2020). Ao determinar a CIM do OE de *C. sinensis*, Akarka e Sevik (2021) e Evangelho et al (2019) em cepas bacterianas, *S. aureus* foi a cepa que apresentou maior sensibilidade frente ao OE. Os autores também testaram a atividade do OE contra espécies fúngicas como *Candida tropicalis* e *Aspergillus flavus*, apresentando CIM de 0.017 mg/L e (0.058 mg/L), indicando, portanto, atividade antifúngica assim como encontrado no presente estudo com a cepa de *C. albicans*.

O OE-03 apresentou inibição mínima de crescimento apenas para as cepas de *P. aeruginosa* (2,00 µg/mL) e *C. albicans* (1,00 µg/mL), apresentando CFM também de 1,00 µg/mL para *C. albicans*. O resultado obtido pela difusão em ágar do OE-03 com o *S. aureus* ($19,6 \pm 1,19$) corrobora com o resultado obtido no estudo de Sehata et al., (2021) que, no mesmo teste, utilizando OE de *Citrus limon*, obteve zona de inibição de $10,56 \pm 0,90$. De acordo com Bordes et al (2019), a atividade antibacteriana do OE de limão está relacionada com os componentes fenólicos como a quercetina e naringenina, responsáveis por aumentar a permeabilidade da membrana celular bacteriana, resultando em um desbalanço na integridade da membrana. Além disso, estes flavonoides podem inibir o metabolismo e síntese do DNA e RNA das bactérias.

A cepa de *S. aureus* apresentou menor CIM (2 µg/mL) e CBM (8 µg/mL) para o OE – 04, quando comparados com os demais OEs, além de apresentar halo de inibição de 11,26 mm no teste de difusão em ágar. Da mesma forma, Jeyakumar et al., (2011) avaliaram a atividade antimicrobiana do óleo de menta (*M. piperita*) frente a diversas cepas bacterianas através do teste de diluição em caldo e difusão em ágar. Dentre as cepas testadas, observou-se que *S. aureus* apresentou inibição de crescimento em baixas concentrações (0,03 µl/mL) apontando também uma zona de inibição relevante entre 12 e 9,30 mm, em uma concentração de 5%.

Além do estudo de Jeyakumar et al., (2011), é possível encontrar ainda diversos outros resultados que apontam o óleo de *M. piperita* como um potente antimicrobiano (İŞCAN et al., 2002; BAZARGANI; ROHLOFF, 2016; HORVÁTH; KOŠČOVÁ, 2017) e também como um agente anti-biofilme. Bazargani e Rohloff (2016) demonstraram por meio de testes *in vitro* que o OE da *M. piperita* apresenta atividade contra a formação de biofilme de cepas de *S. aureus* e

E. coli, sugerindo, dessa forma, que esse OE possa ser empregado para fins farmacêuticos futuramente.

Com relação a atividade antifúngica, o OE – 04 apresentou CIM de 1 mg/mL para a cepa de *C. albicans*. Por outro lado, no teste de difusão em ágar, não apresentou formação halo. Resultado semelhante foi encontrado por Iscan et al., (2002) que, ao avaliar as propriedades antifúngicas do OE da *M. piperita* por microdiluição em caldo utilizando *C. albicans*, observou que tanto os óleos quanto os compostos isolados apresentaram baixa atividade antifúngica na concentração de 5,00 mg/mL, indicando resistência apresentada pelo fungo frente ao OE de *M. piperita*.

Como citado anteriormente, a atividade antimicrobiana dos OE é influenciada por diversos fatores que vão desde o modo de extração até a concentração utilizada para a análise. Embora os resultados obtidos no presente estudo foram realizados a partir de produtos finalizados, ou seja, já disponíveis para o consumidor final e, conseqüentemente, obtido por condições diferentes dos OEs descritos na literatura, observa-se que é possível constatar atividade antimicrobiana significativa dos óleos estudados através dos testes realizados.

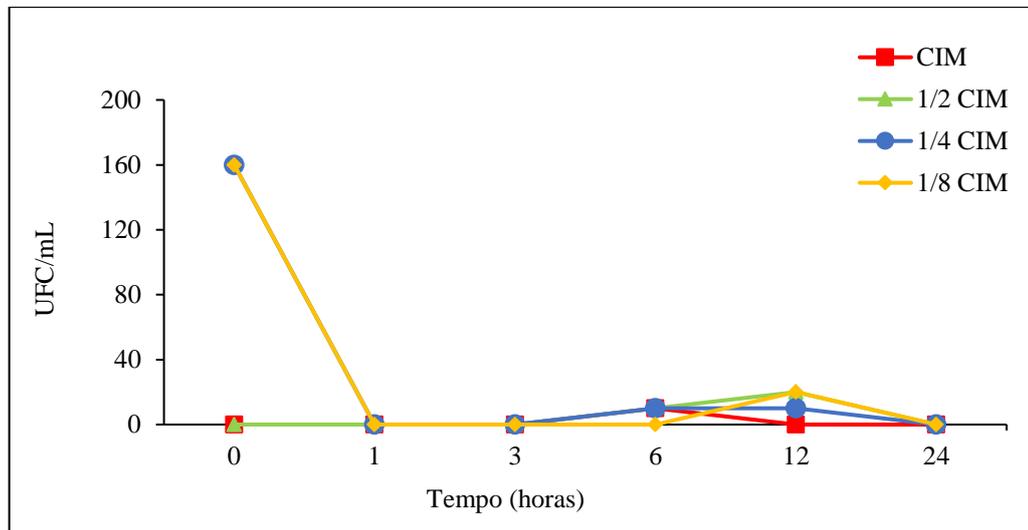
5.2 Efeitos dos OEs nas curvas de tempo de morte bacteriana (time-kill)

Para o teste *time-kill* apenas os OE-01, OE-02 e OE-04 foram selecionados, uma vez que o OE-03 não apresentou atividade antimicrobiana contra o *S. aureus* que foi a cepa que apresentou maior sensibilidade frente aos óleos. Os dados encontrados estão dispostos nas Figuras 12 (a), (b) e (c).

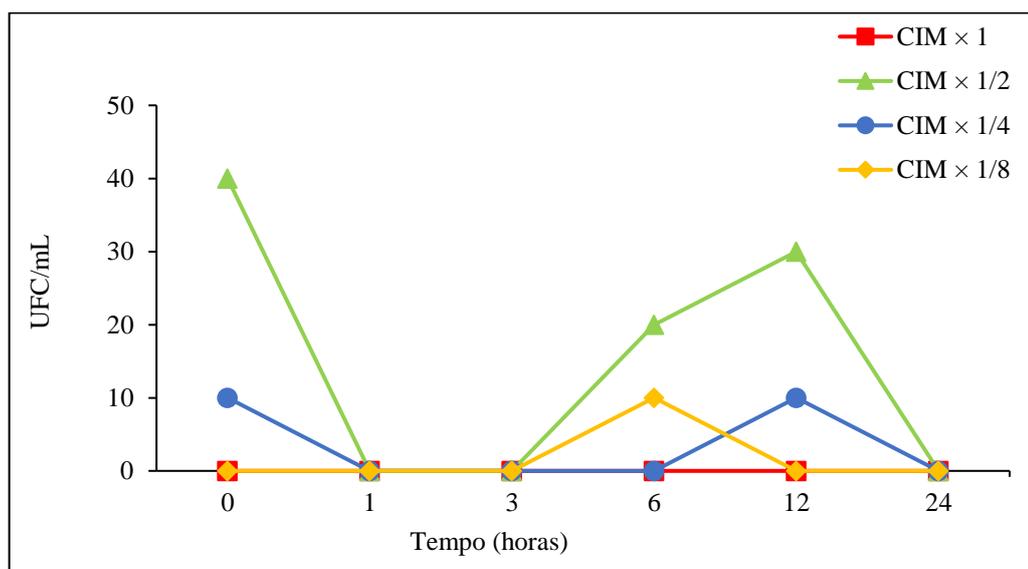
Ao analisar os dados, diferenças importantes na atividade bacteriana foram encontradas para os diferentes OEs, como esperado. As concentrações 1/4 e 1/8 do CIM do OE-01 não provocaram morte bacteriana imediatamente ao entrar em contato com o *S. aureus*, diferentemente das concentrações maiores 1/2 e 1 × CIM (4,00 mg/mL), indicando, portanto, um efeito bactericida dose-dependente. O início da ação das concentrações menores ocorre entre 1 a 3 h de contato com o microrganismo para 1/4 do CIM e 1 a 6 h para 1/8 do CIM.

Figura 12 - Curva de morte do *S. aureus* após aplicação dos OEs

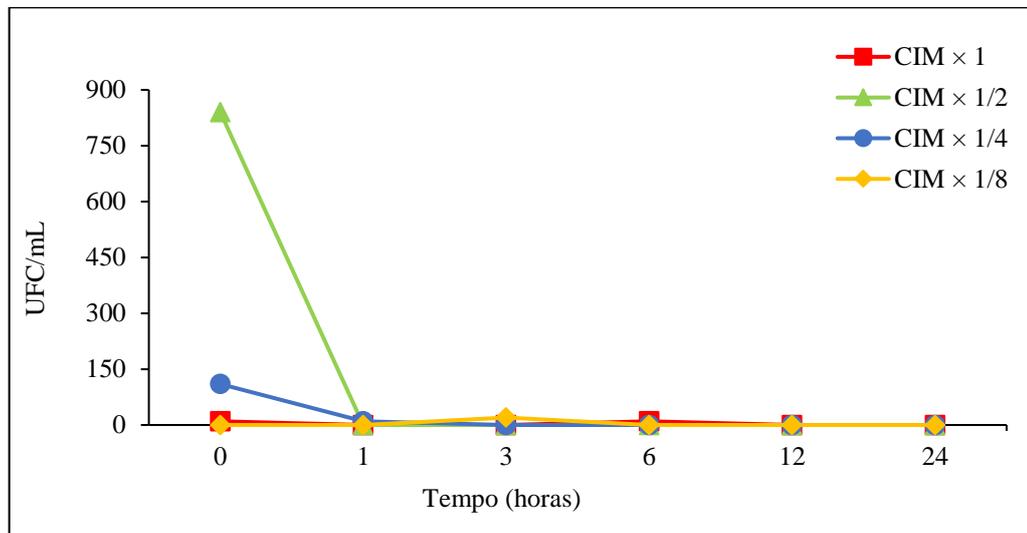
(a) OE-01



(b) OE-02



(c) OE-04



Fonte: Acervo próprio.

No OE-02, as concentrações CIM \times 1 e 1/8 do CIM provocaram a morte dos microrganismos assim que entraram em contato com os mesmos, indicando um efeito bactericida na concentração CIM \times 1 e 1/8 do CIM. Na concentração 1/8 do CIM observa-se também um efeito bacteriostático, uma vez que apresenta crescimento bacteriano a partir de 3 h de contato com os microrganismos. Este mesmo efeito também pode ser visualizado nas concentrações 1/2 e 1/4 do CIM. De maneira geral, o melhor tempo de ação para todas as concentrações é entre 1 e 3 h para este OE.

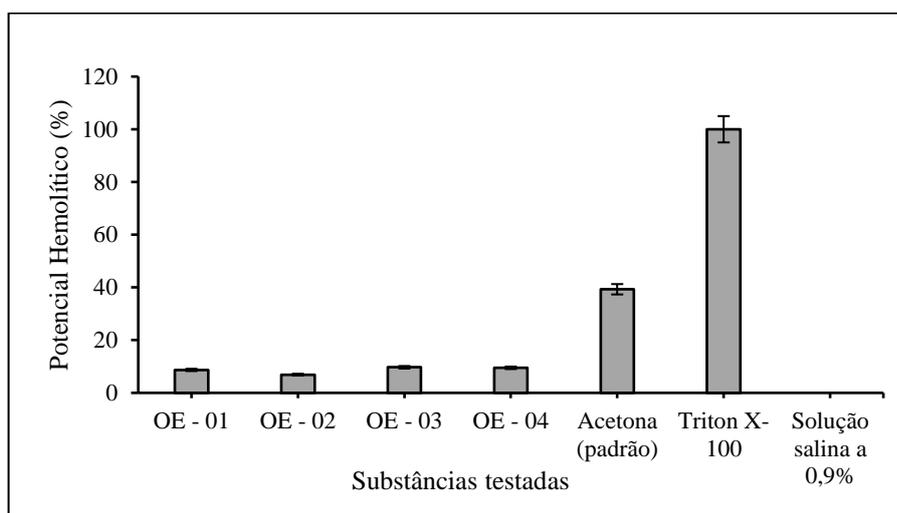
No OE-04 as concentrações CIM \times 1 e 1/8 do CIM apresentaram atividade bactericida a partir do tempo 0, ou seja, no momento em que entraram em contato com o microrganismo. As concentrações 1/2 e 1/4 do CIM também apresentaram característica bactericida, porém iniciando após 1 h de contato com as bactérias. Não foram encontrados estudos realizando este teste para os OEs em estudo de forma isolada.

5.3 Avaliação da toxicidade *in vitro* pelo ensaio de atividade hemolítica

A atividade hemolítica foi avaliada, uma vez que, mesmo que determinada substância apresente potente atividade antimicrobiana, seu uso em preparações farmacológicas será inviável na presença de efeito hemolítico, considerado um forte indicador de toxicidade. A lise da hemoglobina é observada no teste de hemólise a partir da alteração da membrana plasmática

das hemácias, liberando a hemoglobina contida nessas células. Por isso, analisa-se a hemoglobina extracelular em diferentes concentrações (HALLA et al., 2020). O resultado do teste de toxicidade *in vitro* dos OE pode ser observado na Figura 13.

Figura 13 - Potencial hemolítico dos OEs



Fonte: Acervo próprio.

A avaliação da toxicidade *in vitro* por meio de eritrócitos humanos é um método alternativo permitindo observar o nível de toxicidade que pode ser classificada como baixa, moderada ou alta. A atividade hemolítica é considerada baixa quando apresentar valores abaixo de 40%; moderada entre 40-80% e alta acima de 80% (NORFIANI et al., 2011; FIGUEIREDO JUNIOR et al., 2021).

Dessa forma, ao analisar os dados da figura 13, observa-se que os óleos apresentam toxicidade muito baixa ($\leq 40\%$) e similar uns aos outros na concentração em que foram analisados. O padrão utilizado no ensaio foi a acetona, considerada um solvente amplamente utilizado na indústria farmacêutica, sendo bastante tóxica, irritante, podendo causar ressecamento da pele e eritema, apresentando também toxicidade contra células sanguíneas, como visualizadas no resultado do teste em questão (FIGUEIREDO JÚNIOR, 2011).

Na avaliação da toxicidade da *M. piperita* e outros OE realizada por Halla et al., (2020), foi constatado que o percentual hemolítico é diretamente proporcional ao aumento da concentração dos óleos. Os autores também observaram que o potencial hemolítico da *M. piperita* na concentração de 3.12 mg/mL, depois de 120 minutos em contato com eritrócitos humanos foi de 72,88%, sendo considerada, portanto, uma toxicidade moderada,

diferentemente do resultado obtido no presente estudo em que a toxicidade foi considerada baixa (9,5%).

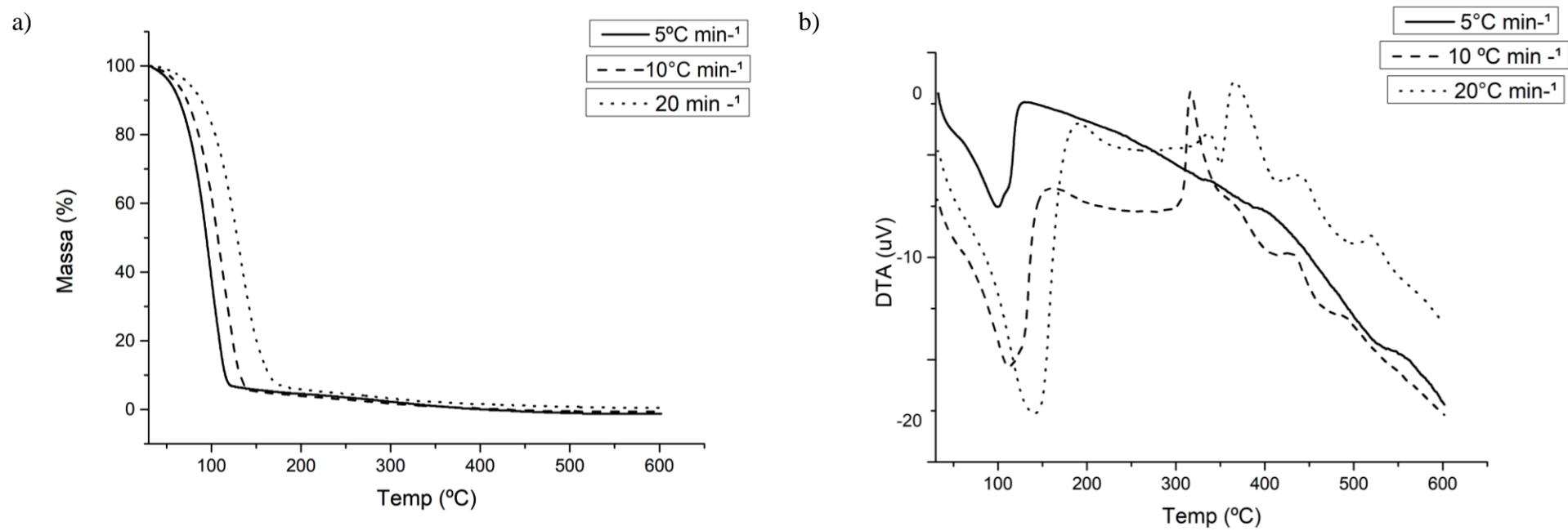
Diversos fatores podem ter influenciado na baixa toxicidade obtida, uma vez que houve diferenças na metodologia utilizada em comparação com a descrita por Halla et al., (2020), assim como o modo de obtenção, a composição e a concentração dos óleos para a análise, uma vez que este estudo tem como objeto de análise formulações obtidas em escala industrial, prontas para utilização dos consumidores.

Diferentemente dos resultados obtidos por Halla et al., (2020), Qadir et al., (2018), apesar de avaliarem a toxicidade de OE de outras espécies que não *M. piperita*, obtiveram baixo percentual tóxico, utilizando metodologia semelhante a utilizada neste trabalho, assim como no trabalho de Halla et al., (2020). As espécies de plantas utilizadas no estudo de Qadir et al., (2018) foram *Citrus reticulata*, *Citrus sinensis*, and *Citrus x sinensis* com potencial hemolítico de apenas $0,29 \pm 0,02$, $1,09 \pm 0,34$ e $0,62 \pm 0,12$, respectivamente. Este resultado se aproxima dos resultados encontrados no estudo atual em que o potencial hemolítico do OE de *C. sinensis* (laranja) foi de apenas 6,9%, sendo classificado, portanto, como pouco hemolítico. Para os demais OE não foram encontrados dados sobre o potencial hemolítico para avaliação da toxicidade.

5.4 Análise Termogravimétrica Diferencial (DTA) e Termogravimetria (TG)

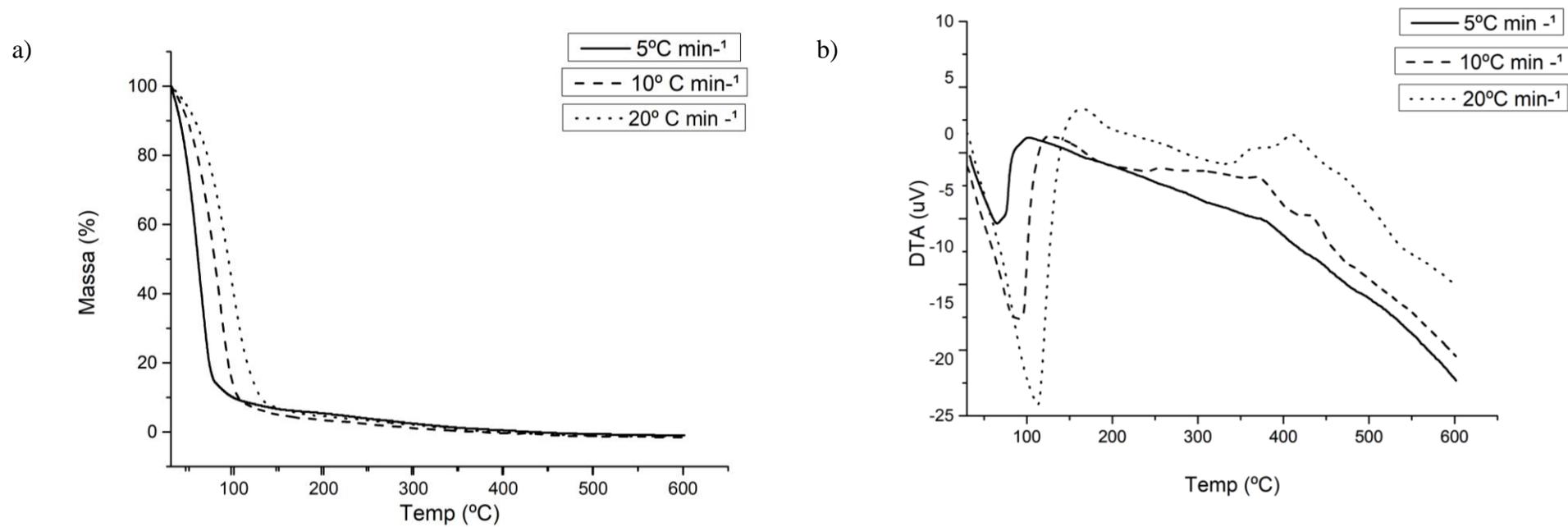
A volatilidade dos OEs desempenha um fator crítico para o manuseio apropriado em que as propriedades biológicas destes produtos sejam apropriadas desde sua formulação até a utilização pelo consumidor final. O conhecimento a respeito deste parâmetro se dá por técnicas termoanalíticas capazes de detectar eventos de perda de massa, polimerização e degradação oxidativa (GONZÁLES-RIVERA et al., 2015). No presente trabalho, a volatilização dos OEs foi avaliada pelas técnicas de DTA e TG, representadas nos gráficos das Figuras 13 a 17 a seguir. Os eventos térmicos observados na razão de aquecimento = $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$, estão dispostos na Tabela 5.

Figura 14 - (a) TG do OE-01; (b) DTA do OE-01



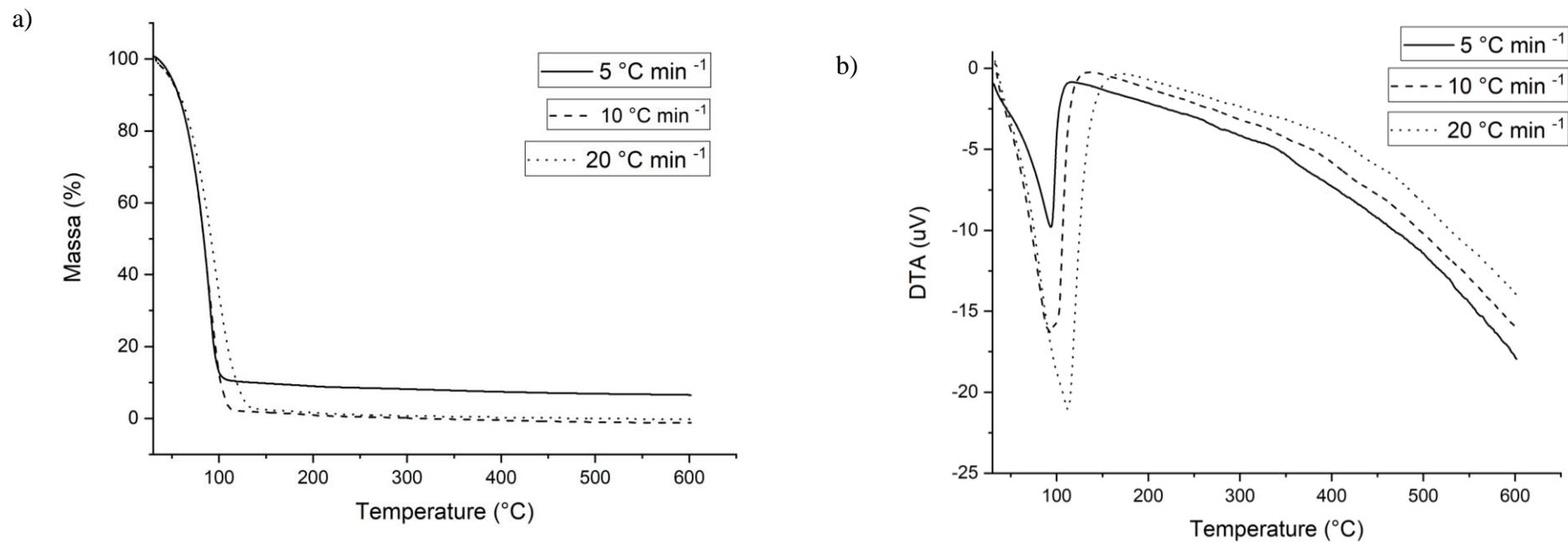
Fonte: Acervo próprio.

Figura 15 - (a) TG do OE-02; (b) DTA do OE-02



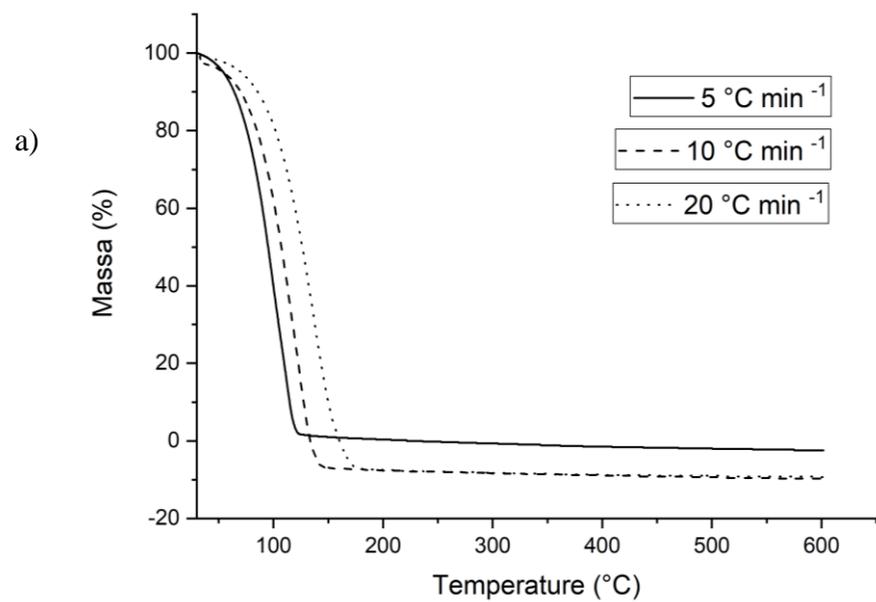
Fonte: Acervo próprio.

Figura 16 – (a) TG do OE-03; (b) DTA do OE-03



Fonte: Acervo próprio.

Figura 17 – (a) TG do OE-04; (b) DTA do OE-04



Fonte: Acervo próprio.

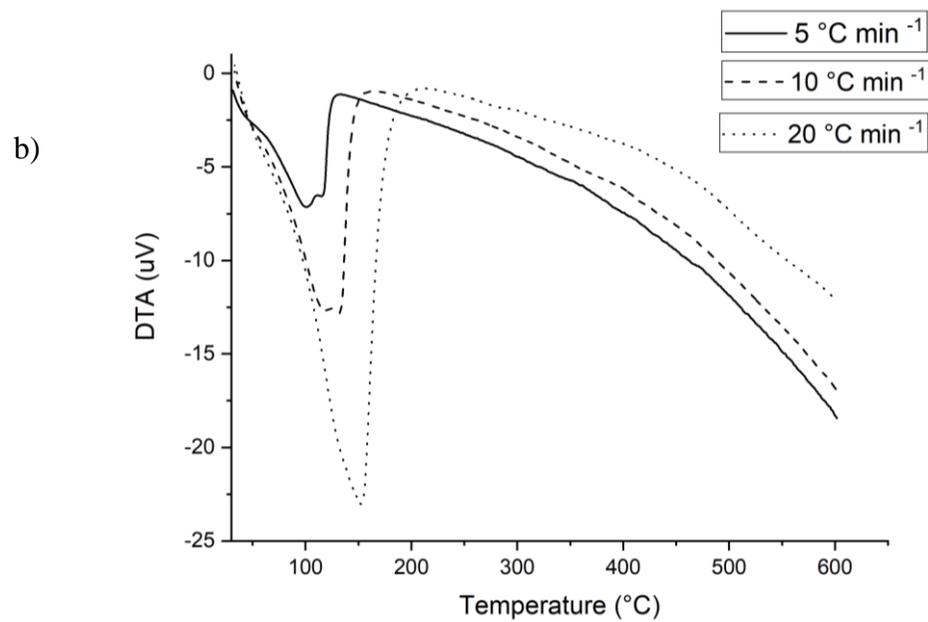


Tabela 4 – Eventos térmicos das curvas termogravimétricas dos OEs (razão de aquecimento = 10 °C min⁻¹)

Eventos	Óleos essenciais			
	OE – 01 (Lavanda)	OE – 02 (Laranja)	OE – 03 (Limão)	OE – 04 (Menta)
T inicial (°C)	120,00	58,43	68,62	91,96
T final (°C)	149,43	99,76	101,22	134,27
Perda de massa	93,48%	92,46%	89,33%	92,85%

Fonte: Acervo próprio.

Ao confrontar os dados das Figuras 5, 6, 7 e 8 com os dados da Tabela 5 é possível inferir que, nas curvas termogravimétricas, a degradação dos OEs ocorre em apenas uma etapa, decorrente da volatilização dos mesmos, confirmada pelos picos endotérmicos nas curvas DTA Figura 5(b), 6(b), 7(b) e 8(b). Observa-se uma rápida perda de massa em função do tempo e temperatura, decorrente da instabilidade térmica evidenciada pela não formação de um platô nas curvas termogravimétricas. As massas perdidas começam em temperaturas distintas, sendo o OE-02 (laranja) o que apresentou a temperatura de volatilização mais baixa (58,43 °C), seguido do OE-03 (limão: 68, 62 °C), OE-04 (menta: 91,96 °C) e OE-01 (lavanda: 120,00 °C).

Na literatura, para o OE-01 (lavanda), resultado semelhante foi encontrado por González-Rivera et al. (2016). Ao analisar a decomposição térmica de determinados óleos essenciais, os autores observaram que a perda de massa total do OE de lavanda (*Lavandula angustifolia*), ocorreu na temperatura aproximada de 175°C, estando próximo a temperatura encontrada no presente estudo (149,43 °C).

A temperatura final de degradação do OE-02 (laranja) (99,76 °C) também foi próxima a encontrada no estudo realizado por Martins et al., (2011), que determinou o perfil termogravimétrico do OE de laranja (*Citrus sinensis*), constatando temperatura final de degradação igual a 118,1 °C. Neste mesmo estudo, os autores também avaliaram o perfil termogravimétrico do OE de limão, que apresentou temperatura final de degradação igual a 166,7 °C, enquanto que, no presente estudo, a temperatura foi de 101,22 °C.

Para o OE-04 (menta), resultado divergente também foi encontrado na literatura em um estudo realizado por Ochocka et al (1990), em que o perfil termogravimétrico de diversas espécies de plantas. Para o OE de limão, a temperatura final de degradação foi de 180 °C, sendo superior a temperatura detectada no presente estudo.

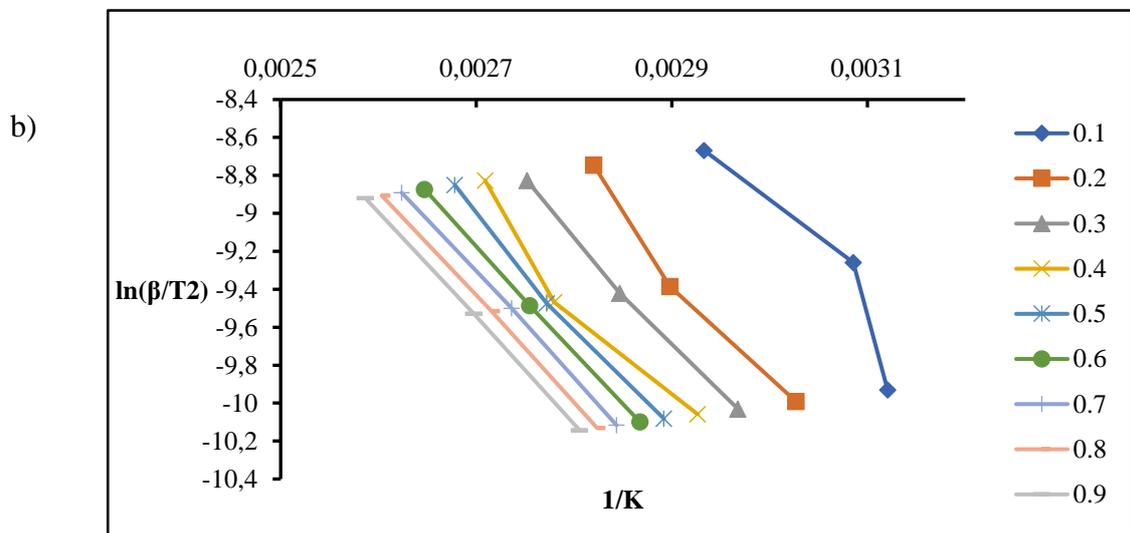
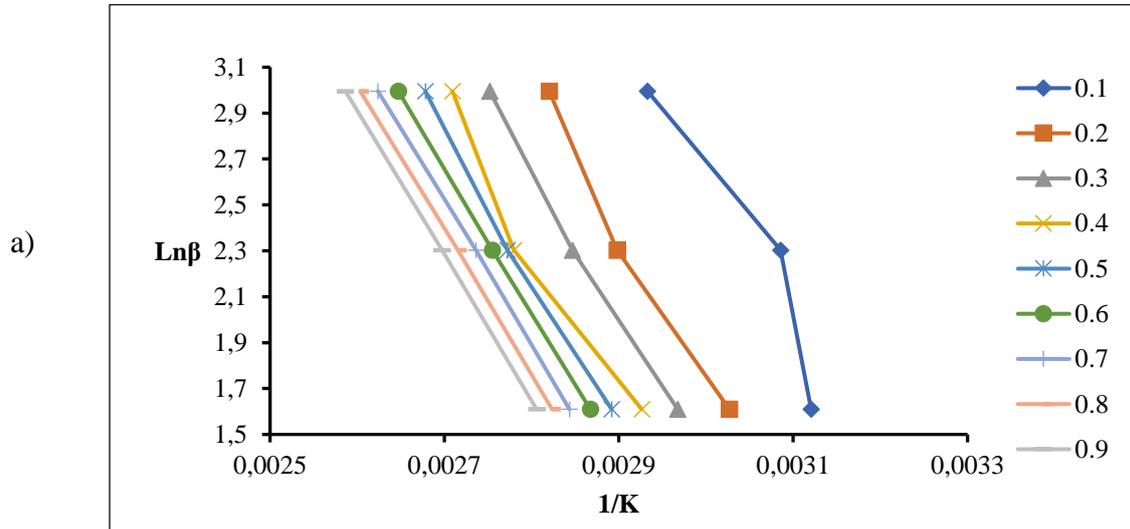
Ao analisar as curvas termogravimétricas, também é possível observar que, conforme a razão de aquecimento aumenta, a curva desloca-se levemente para a direita. Segundo Dhaundiyal e Hanon (2018), em casos de razões de aquecimento baixas, maior quantidade de energia térmica está disponível para o sistema e o fluxo de nitrogênio necessita de um maior tempo para atingir o equilíbrio com a temperatura da amostra. Quando a razão de aquecimento é alta, o tempo necessário para o início da reação é reduzido em altas taxas de aquecimento e, assim, o tempo da reação também diminui.

5.5 Cinética de degradação não isotérmica

Na análise cinética do estado sólido de substâncias, os modelos isoconversionais são os mais utilizados para determinação da energia de ativação (E_a), estabelecendo que o modelo da reação $f(\alpha)$ na equação é independente das taxas de aquecimento em diferentes razões de aquecimento do experimento (COSTA et al., 2021; SOKOTO et al., 2016). De acordo com Huyn et al. (2020), a energia de ativação é definida como a energia necessária para que uma reação ocorra, também sendo conhecida como uma barreira responsável por quebrar as ligações existentes entre as moléculas criando um estado de transição.

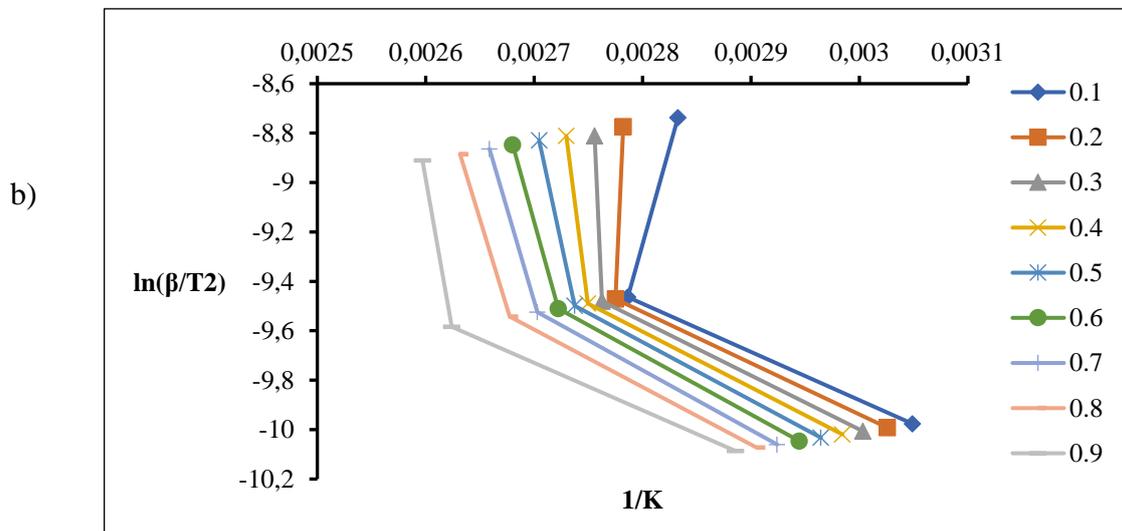
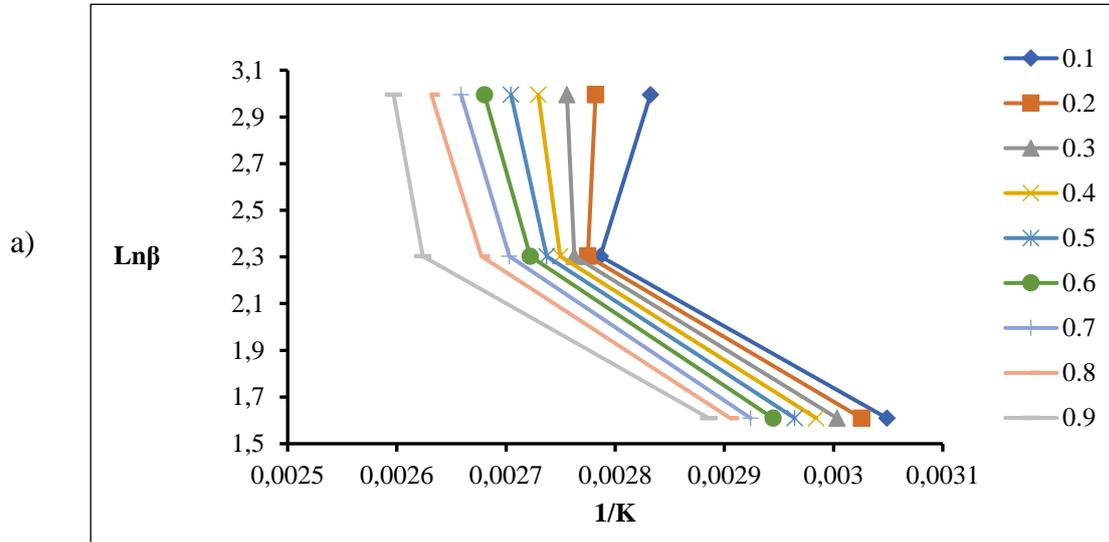
Os parâmetros cinéticos dos OEs foram estimados utilizando os modelos de FWO e KAS e estão representados nos gráficos das Figuras 18, 19, 20 e 21 que representam os gráficos das conversões ($\alpha= 0,1 - 0,9$) para cada um dos óleos.

Figura 18 – Gráficos para os métodos isoconversionais (a) Flynn–Wall–Ozawa e (b) Kissinger–Akahira–Sunose (KAS) do OE – 01



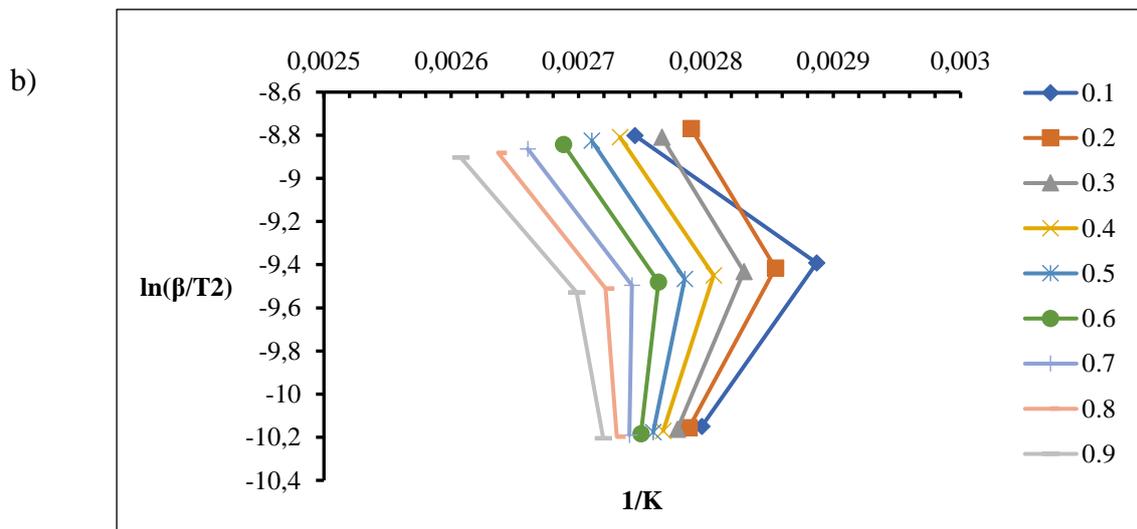
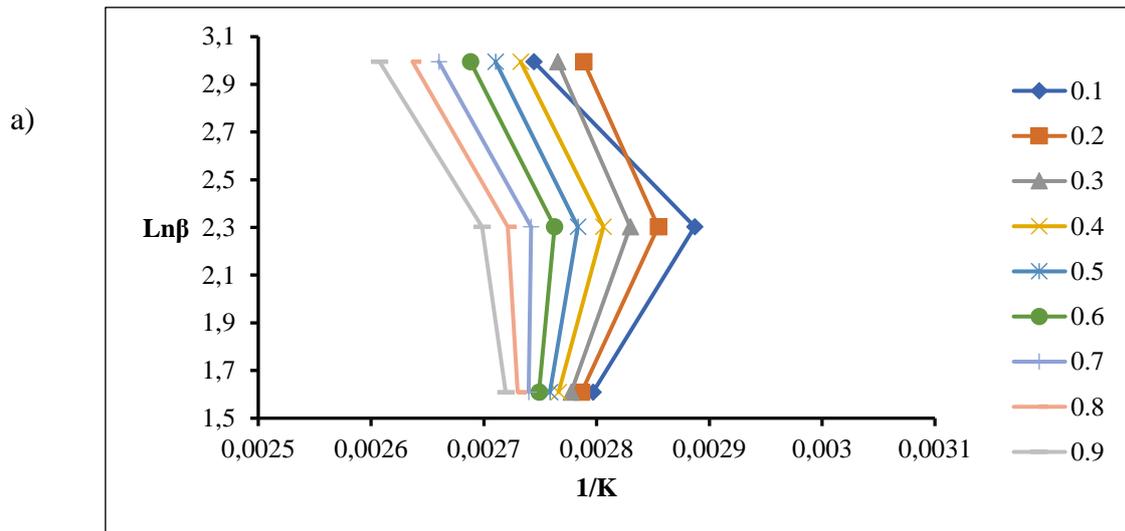
Fonte: Acervo próprio.

Figura 19 – Gráficos para os métodos isoconversionais (a) Flynn–Wall–Ozawa e (b) Kissinger–Akahira–Sunose (KAS) do OE – 02



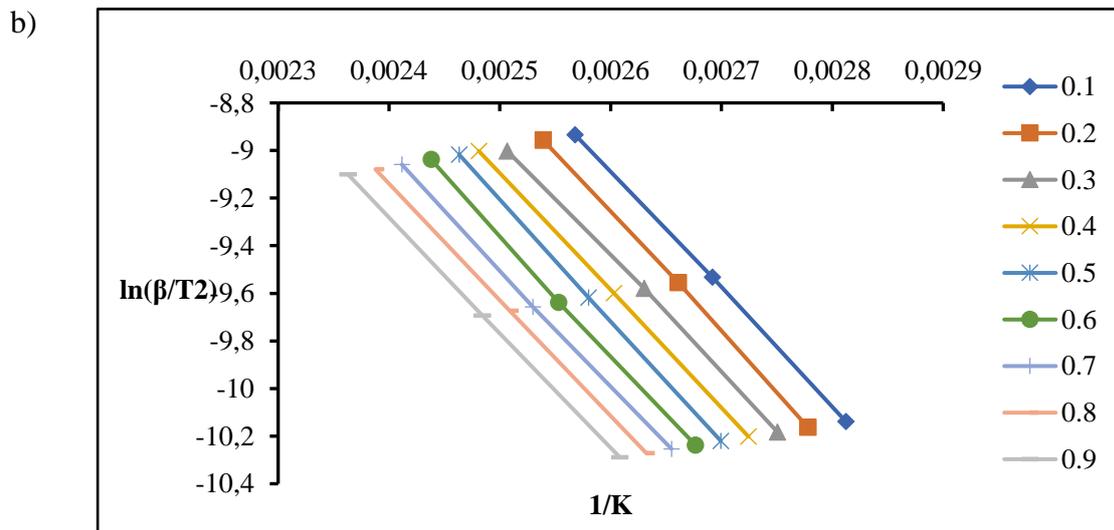
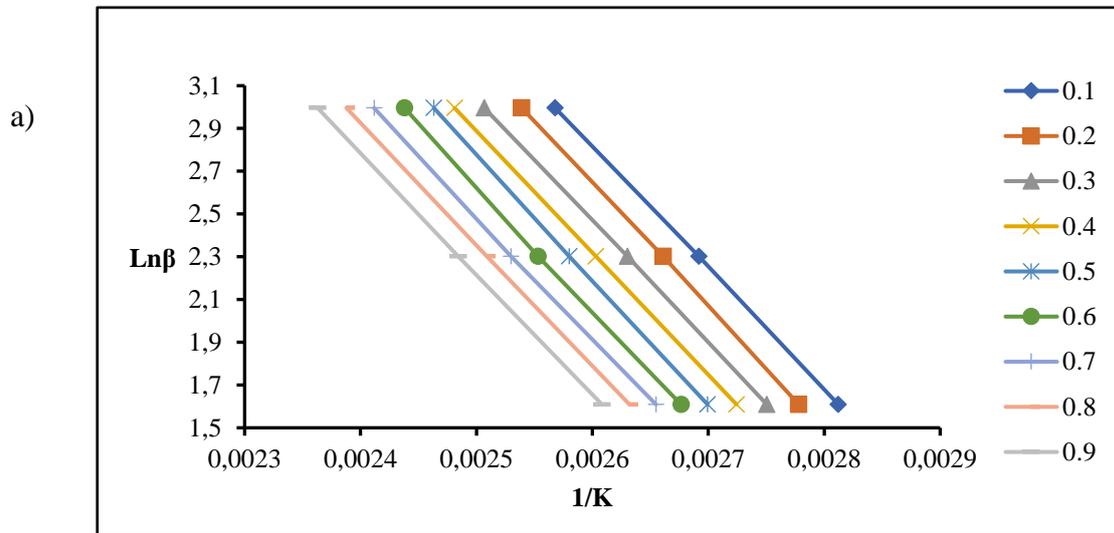
Fonte: Acervo próprio.

Figura 20 – Gráficos para os métodos isoconversionais (a) Flynn–Wall–Ozawa e (b) Kissinger–Akahira–Sunose (KAS) do OE – 03



Fonte: Acervo próprio.

Figura 21 – Gráficos para os métodos isoconversionais (a) Flynn–Wall–Ozawa e (b) Kissinger–Akahira–Sunose (KAS) do OE – 04



Fonte: Acervo próprio.

A energia de ativação (E_a) corresponde a facilidade com a qual o processo de degradação ocorre (SOKOTO et al., 2016). No presente estudo, a E_a foi determinada para cada OE, utilizando os modelos FWO e KAS descritos anteriormente (tópico 3.2.1). Os dados obtidos estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5 – E_a obtida pelos modelos FWO e KAS para os OEs em estudo

Óleos essenciais	KAS	FWO
	E_a (kJ/Mol)	
OE-01	49,97	46,36
OE-02	36,01	29,07
OE-03	86,53	62,63
OE-04	46,55	40,36

Fonte: Acervo próprio.

Ao analisar as Figuras de 18 a 21 e a Tabela 5 é possível inferir que a E_a é diferente para cada fração das conversões analisadas, indicando que o processo de decomposição dos OEs não é o mesmo durante todo o processo e que ocorre em várias etapas, com exceção do OE-04. Ao contrário dos demais, o processo de degradação deste OE ocorre em apenas uma etapa de decomposição, que pode ser observado pela linha reta através do ajuste linear em todas as frações analisadas.

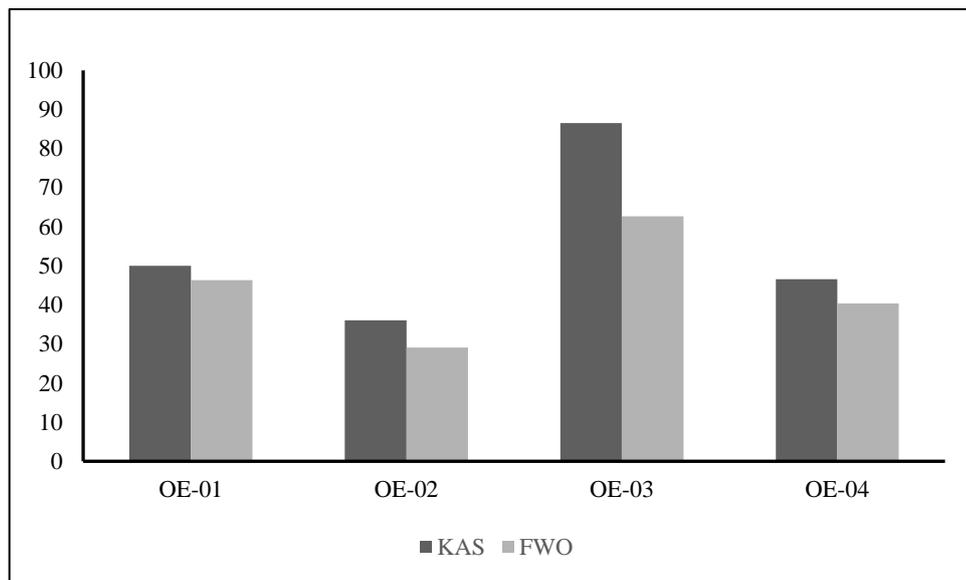
Além disso, é possível observar na Tabela 5 que o OE-02 é o que apresenta menor energia de ativação em ambos os métodos utilizados, indicando que dentre os OEs em estudo, este apresenta-se como o mais sensível termicamente. O OE-02 também foi o OE que apresentou melhor atividade antibacteriana nos ensaios microbiológicos. Estes achados indicam que, em caso da aplicação/utilização deste OE, maior atenção deve ser dada no que diz respeito a temperatura empregada. Caso contrário, os efeitos terapêuticos esperados serão comprometidos devido a volatilização dos seus componentes que tem início por volta de 58,43 °C, como podemos observar nos dados da TG (Tabela 4).

Na literatura, é possível encontrar valores ainda mais baixos de E_a para o OE de laranja. Martins et al., (2011) e Hazra et al. (2004) ao determinar a cinética de degradação do OE de laranja (*Citrus sinensis*) obtiveram valores de E_a iguais a 38,24 e 38,86 kJ/mol⁻¹, respectivamente. De acordo com Martins et al., (2011), baixas variações na E_a podem estar

ligados as diferentes razões de aquecimento empregadas na TG, além das diferentes composições dos OEs.

Ao comparar a E_a encontrada pelos dois métodos (Figura 22), é possível observar apenas pequenas diferenças entre os modelos KAS e FWO, indicando que ambos são úteis para a análise da cinética de degradação de OEs.

Figura 22 – Comparação dos modelos cinéticos FWO e KAS



Fonte: Acervo próprio.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após análise dos quatro OE testados é possível inferir que tanto o teste de microdiluição em caldo como a difusão em ágar constituem bons métodos para avaliação da atividade antimicrobiana de OE. Observou-se que todos os óleos apresentaram atividade para as cepas Gram-positivas, Gram-negativas e fungo testado.

Levando em consideração os dados obtidos, é possível inferir que o OE de laranja apresentou melhor atividade microbiana frente as cepas testadas e que a cepa de *C.albicans* é mais sensível frente aos OEs, seguida de *S. aureus*. A curva de morte apontou diferenças importantes na atividade bacteriana dos OEs, que apresentaram comportamento bacteriostático e bactericida em diferentes concentrações.

O potencial hemolítico observado foi satisfatório, uma vez que os OEs apresentaram potencial hemolítico inferior a 40%, sendo considerados pouco hemolíticos. É importante ressaltar que, apenas o teste de citotoxicidade em eritrócitos humanos de forma isolada, não é capaz de determinar o nível de toxicidade das substâncias em questão, sendo necessário a realização de outros testes *in vitro* e *in vivo* para estabelecer o nível de toxicidade.

Com a análise térmica, foi possível identificar os eventos térmicos de cada um dos OEs. O OE-02 foi o que apresentou temperatura inicial de decomposição mais baixa (58,43 °C), além da menor E_a (36,01 pelo modelo KAS e 29,07 kJ/mol⁻¹ para o modelo FWO) evidenciada pela cinética de degradação. Com exceção do OE-04, todos os OEs apresentam diferentes etapas de degradação indicando que o processo não é o mesmo durante a decomposição.

Assim, os dados obtidos com o presente estudo fornecem subsídios importantes para a comunidade científica no que diz respeito a atividade antibacteriana e avaliação térmica dos OEs comerciais testados. Com essas informações, mais estudos podem vir a ser realizados, visando incorporar os OEs em preparações farmacêuticas e/ou alimentícias. Além disso, os dados termoanalíticos apontaram informações valiosas tanto para o controle de qualidade destes produtos comerciais como para a utilização ou o preparo de outras formulações contendo OEs, uma vez que foram determinadas as temperaturas em que se inicia a degradação dos óleos, bem como a E_a de ativação de cada um deles.

REFERÊNCIAS

- ADASZYNSKA-SKWIRZYNSKA, M.; DZIECIOL, M. Comparison of Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oils Obtained from Different Cultivars and Morphological Parts of *Lavandula angustifolia*. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 21, n. 6, p. 1532–1541, 2 nov. 2018.
- ADORJAN, B.; BUCHBAUER, G. Biological properties of essential oils: an updated review. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, n. 6, p. 407–426, nov. 2010.
- ALEXA, E.; DANCIU, C.; RADULOV, I.; OBISTIQU, D.; SUMALAN, R. M.; MORAR, A.; DEHELEAN, C. A. Phytochemical Screening and Biological Activity of *Mentha × piperita* L. and *Lavandula angustifolia* Mill. Extracts. **Analytical Cellular Pathology**, v. 2018, p. 1–7, 2018.
- ANDRADE, B. F. M. T.; BARBOSA, N. L.; PROBST, A. F. Antimicrobial activity of essential oils. **Journal of Essential Oil Research**, v. 26, n. 1, p. 34–40, 2 jan. 2014.
- ALJAAFARI, M. N.; ALALI, A. O.; BAQAIS, L.; ALQUBAISY, M.; ALALI, M.; MOLOUKI, A.; ONG-ABDULLAH, J.; ABUSHELAIBI, A.; LAI, K. S.; LIM, S.H.E. An Overview of the Potential Therapeutic Applications of Essential Oils. **Molecules**, v. 26, n. 3, p. 628, 26 jan. 2021.
- BALART, R.; GARCIA-SONOQUERRA, D.; QUILES-CARRILO, L.; MONTANES, N.; TORRES-GINER, S. Kinetic Analysis of the Thermal Degradation of Recycled Acrylonitrile-Butadiene-Styrene by non-Isothermal Thermogravimetry. **Polymers**, v. 11, n. 2, p. 281, 7 fev. 2019.
- BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of pharmaceutical analysis**, v. 6, n. 12, p. 71-79, 2016.
- BAZARGANI, M. M.; ROHLOFF, J. Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms. **Food Control**, v. 61, p. 156–164, mar. 2016.
- BRANDÃO, D. O. **Desenvolvimento de uma formulação de uso intracanal com atividade antimicrobiana obtida a partir de uma planta do semiárido brasileiro**. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual da Paraíba, p. 73, 2014.
- BROWN, M. E.; MACIEJEWSKI, S.; VYAZOVKIN, S.; NOMEN, R.; SEMPERE, J.; BURNHAM, A.; OPFERMANN, J.; STREY, R.; ANDERSON, H. L.; KEMMLER, A.; KEULEERS, R. et al. Computational aspects of kinetic analysis Part A: The ICTAC kinetics project-data, methods and results. **Thermochimica Acta**, p. 19, 2000.

CHAAR, J. S.; Mouchreck-Filho, V.E.; Breviglieri, S. T.; Cavalheiro, E. T. G.; Chierice, G. O. Boiling temperatures and enthalpy changes of Essential oils. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 75, n. 2, p. 437–443, 2004.

CHOUHAN, S.; SHARMA, K.; GULERIA, S. Antimicrobial Activity of Some Essential Oils—Present Status and Future Perspectives. **Medicines**, v. 4, n. 3, p. 58, 8 ago. 2017.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Norma M7-A6. Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico. Pennsylvania, 6ª edição, 2005.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard, vol. 28, no. 14, CLSI document M27-A3, Wayne, PA, USA, 3ª edição, 2008.

DE MARTINO, L.; FEO, D.V.; NAZZARRO, F. Chemical composition and *in vitro* antimicrobial and mutagenic activities of seven *Lamiaceae* essential oils. **Molecules**. v. 14, p. 4213-4230, 2009.

DÉTÁR, E., NEMETH, E. Z.; GOSTZOLA, B.; DEMJÁN, I.; PLUHÁR, Z. Effects of variety and growth year on the essential oil properties of lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.) and lavandin (*Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel.). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 90, p. 104020, jun. 2020.

DHAUNDIYAL, A.; HANON, M. M. Calculation of Kinetic Parameters of the Thermal Decomposition of Residual Waste of Coniferous Species: *Cedrus Deodara*. **Acta Technologica Agriculturae**, v. 21, n. 2, p. 75–80, 1 jun. 2018.

ELGAT, W. A. A. A.; KORDY, A. M. K.; BOHM, M.; CERNY, R.; ABDEL-MEGEED, A.; SALEM, M. Z. M. Eucalyptus camaldulensis, Citrus aurantium, and Citrus sinensis Essential Oils as Antifungal Activity against *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, and *Fusarium culmorum*. **Process**, 8, 103, 2020.

EVANGELHO, J. A.; DANNENBERG, G. S.; BIDUSKI, B.; HALAL, S. L. M.; KRINGEL, D. H.; GULARTE, M. A.; FIORENTINI, A. M.; ZAVAREZE, E.R. Antibacterial activity, optical, mechanical, and barrier properties of corn starch films containing orange essential oil. **Carbohydrate Polymers**, v. 222, p. 114981, out. 2019.

FERNANDES, F. H A. **Estudo químico-farmacológico e desenvolvimento galênico de *Spondias dulcis* Forst.** (Tese de doutorado em Ciências Farmacêuticas). Araraquara, São Paulo, p. 151, 2017.

FIGUEIREDO JUNIOR, E. C.; CAVALCANTI, Y. W.; LIRA, A. B.; PESSOA, H. L. F.; LOPES, W. S.; DA SILVA, D. R.; FREIRES, I. A.; ROSALEN, P. L.; COSTA, E. M. M. B.;

GARCIA, C. G.; VALÉRIO, P. P. Estudo da cinética de degradação térmica do óleo vegetal de palma. **e-xacta**, v. 10, n. 2, p. 81, 30 nov. 2017.

- GARZOLI, S.; TURCHETTI, G.; GIACOMELLO, P.; TIEZZI, A.; MASCI, V. L.; OVIDI, E. Liquid and Vapour Phase of Lavandin (*Lavandula × intermedia*) Essential Oil: Chemical Composition and Antimicrobial Activity. **Molecules**, v. 24, n. 15, p. 2701, 25 jul. 2019.
- GISMONDI, A.; MARCO, G. D.; REDI, E. L.; FERUCCI, L.; CANTONETTI, M.; CANINI, A. The antimicrobial activity of *Lavandula angustifolia* Mill. essential oil against *Staphylococcus* species in a hospital environment. **Journal of Herbal Medicine**, v. 26, p. 100426, abr. 2021.
- GONZÁLEZ-RIVERA, J.; DUCE, C.; FALCONIERI, D.; FERRARI, C.; GHEZZI, L.; PIRAS, A.; TINE, M. R. Coaxial microwave assisted hydrodistillation of essential oils from five different herbs (lavender, rosemary, sage, fennel seeds and clove buds): Chemical composition and thermal analysis. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 33, p. 308–318, fev. 2016.
- HALLA, N.; BOUCHERIT, K.; ZERAGUI, B.; DJELTI, A.; BELKHEDIM, R. H.; BENATALLAH, S.; DJELLOUI, H.; KACIMI, O.; BOUCHERIT-OTMANI, Z. Polyphenols Content and Antimicrobial, Antioxidant and Hemolytic Activities of Essential Oils from Four Selected Medicinal Plants Growing in Algeria. **Biology, Medicine, & Natural Product Chemistry**, v. 9, n. 2, p. 65–75, 13 nov. 2020.
- HAZRA A., ALEXANDER K., DOLLIMORE D. AND RIGA, A. A. Characterization of some essential oils and their key components, **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, 75, 317-3301 2004.
- HORVÁTH, P., KOŠČOVÁ, J. In vitro antibacterial activity of mentha essential oils against *staphylococcus aureus*. **Folia Veterinaria**, v. 61, n. 3, p. 71-77, 2017.
- HUYNH, T. T.; MAI, T.; DANG, C. H.; VO, T. T.; NGUYEN, D.; DANG, V.; NGYEN, K. D. V.; TRAN, V.; NGUYEN, T. Influence of extractions on physicochemical characterization and bioactivity of Piper nigrum oils: Study on the non-isothermal decomposition kinetic. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 13, n. 10, p. 7289–7301, out. 2020.
- İŞCAN, G.; KIRIMER, N. KURKCUOGY, M.; BASÜER, K. H.; DEMIRCI, F. Antimicrobial Screening of *Mentha piperita* Essential Oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 14, p. 3943–3946, 1 jul. 2002.
- JEYAKUMAR, E.; LAWRENCE, R.; PAL, T. Comparative evaluation in the efficacy of peppermint (*Mentha piperita*) oil with standards antibiotics against selected bacterial pathogens. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, n. 2, p. S253–S257, out. 2011.
- KISSINGER, H. E. Reaction kinetics in differential thermal analysis. **Analytical chemistry**, v. 29, n. 11, p. 1702-1706, 1957.
- KLEPSEK, M. E.; ERNST, E. J.; LEWIS, R. E.; ERNST, M. E.; PFALLER, M. A. Influence of Test Conditions on Antifungal Time-Kill Curve Results: Proposal for Standardized Methods. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 5, p. 1207-1212, 1998.

- LE, V.-D.; TRAN, V. T.; DANG, V. S.; NGUYEN, D. T.; DANG, C. H.; NGUYEN, T. D. Physicochemical characterizations, antimicrobial activity and non-isothermal decomposition kinetics of *Cinnamomum cassia* essential oils. **Journal of Essential Oil Research**, v. 32, n. 2, p. 158–168, 3 mar. 2020.
- LUIS, A.; DUARTE, A.P.; PEREIRA, L.; DOMINGUES, F. Chemical Profiling and Evaluation of Antioxidant and Anti-Microbial Properties of Selected Commercial Essential Oils: A Comparative Study. **Medicines**, 4, 36, 2017.
- MANGALAGIRI, N. P.; PANDITI, S. K.; JEEVIGUNTA, N. L. L. Antimicrobial activity of essential plant oils and their major components. **Heliyon**, v. 7, n. 4, p. e06835, abr. 2021.
- MARTINS, P.; SBAITE, P.; BENITES, C.; MACIEL, M. Thermal characterization of orange, lemongrass, and Basil essential oils. **Chemical Engineering Transactions**, 24, 463-8, 2011.
- MASTELIC, J.; POLITEO, O.; JERKOVIC, I.; RADOSEVIC, N. Composition and antimicrobial activity of *Helichrysum italicum* and its terpene and terpenoid fractions. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 41, n.1, p. 35-40, 2005.
- MOGANA, R.; ADHIKARI, A.; TZAR, M. N.; RAMLIZA, R.; WIART, C. Antibacterial activities of the extracts, fractions and isolated compounds from *Canarium patentinervium* Miq. Against bacterial clinical isolates. **BMC Complementary Medicines and Therapies**, 55, 20, 2020.
- NASSER AL-JABRI, N.; HOSSAIN, M. A. Comparative chemical composition and antimicrobial activity study of essential oils from two imported lemon fruits samples against pathogenic bacteria. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 3, n. 4, p. 247–253, dez. 2014.
- NAZZARO, F. et al. Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 12, p. 1451–1474, 25 nov. 2013.
- OCHOCKA, R. J.; WESOLOWSKI, M.; LAMPARCZYK, H. Thermoanalysis supported by principal component analysis of essential oil samples. **Thermochemica acta**, 173, 199-210, 1990.
- OLIVEIRA, V. M. L.; PIMENTEL, K. G. B.; SILVA, J. O.; CUNHA, A. C. V. D.; GUIMARAES, N. E. D. S.; FERNANDES, F. H. A. Aplicação do método checkerboard para avaliação de sinergismo antibacteriano em óleos essenciais: uma revisão. **BIOFAR: Revista De Biologia e Farmácia**, v. 17, p. 881-907, 2021.
- OZAWA, T. Non-isothermal Kinetics of Consecutive Reactions. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, p. 8, 2000.
- OZGUVEN, M. M.; TARHAN, S.; POLATACI, H.; TELCI, I. A New Way to Improve the Drying Kinetics and Final Quality of Peppermint. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, 2016. DOI: 10.1080/0972060X.2016.1205522.

PAUW, E.; ELOFF, J. N. Which tree orders in southern Africa have the highest antimicrobial activity and selectivity against bacterial and fungal pathogens of animals? **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 14, n. 317, 2014.

PAW, M.; BEGUM, T.; GOGOI, R.; PANDEY, S. K.; LAL, M. Chemical Composition of Citrus limon L. Burmf Peel Essential Oil from **North East India**. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, p. 1–8, 23 abr. 2020.

PEREIRA, J. V. Phytochemical composition, antifungal activity, in vitro and in vivo toxicity of Syzygium cumini (L.) Skeels leaves extract. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 20, n. 5, 2021.

PEREIRA, M. D. S. V., RIBEIRO, A. D., JÚNIOR, E. C. F., FREIRE, J. C. P., COSTA, M. M. A., & PEREIRA, J. V. Estudo sobre métodos utilizados para a determinação da atividade antimicrobiana de extratos de plantas medicinais: elucidações e limitações das técnicas. **Brazilian Journal of Development**, 8(4), 2022.

PRUSINOWSKA, R.; ŚMIGIELSKI, K. B. Composition, biological properties and therapeutic effects of lavender (*Lavandula angustifolia* L). A review. **Herba Polonica**, v. 60, n. 2, p. 56–66, 2 out. 2014.

RAI, M. PARALIKAR, P.; JOGEE, P.; AGARKAR, G.; INGLE, A. P.; DERITA, M.; ZACHINO, S. Synergistic antimicrobial potential of essential oils in combination with nanoparticles: Emerging trends and future perspectives. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 519, n. 1–2, p. 67–78, mar. 2017.

RAO, J.; CHEN, B.; MCCLEMENTS, D. J. Improving the Efficacy of Essential Oils as Antimicrobials in Foods: **Mechanisms of Action**. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 10, n. 1, p. 365–387, 25 mar. 2019.

QADIR, R. Variations in chemical composition, antimicrobial and hemolytic activities of peel essential oils from three local Citrus cultivars. **Pure and Applied Biology**, v. 7, n. 1, 10 mar. 2018.

RAI, M. PARALIKAR, P.; JOGEE, P.; AGARKAR, G.; INGLE, A. P.; DERITA, M.; ZACHINO, S. Synergistic antimicrobial potential of essential oils in combination with nanoparticles: Emerging trends and future perspectives. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 519, n. 1–2, p. 67–78, mar. 2017.

SERRA, E.; HIDALDO-BAPTISTA, L. A.; VERRAN, J.; WILLIAMS, D.; SLADJANA M. Antifungal Activity of Commercial Essential Oils and Biocides against *Candida Albicans*. **Pathogens**, 7, 15, 2018.

SHAABAN, H. A. E.; EL-GHORAB, A. H.; SHIBAMOTO, T. Bioactivity of essential oils and their volatile aroma components: Review. **Journal of Essential Oil Research**, v. 24, n. 2, p. 203–212, abr. 2012.

SHEHATA, M. G.; AWAD, T. S.; ASKER, D.; EL-SOHAIFY, S. A.; EL-AZIZ, N. M. A.; YOUSSEF, M. M. Antioxidant and antimicrobial activities and UPLC-ESI-MS/MS

polyphenolic profile of sweet orange peel extracts. **Current Research in Food Science**, v. 4, p. 326–335, 2021.

SINGH, R.; SHUSHNI, M. A. M.; BELKHEIR, A. Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 8, n. 3, p. 322–328, maio 2015.

SILVA, G.A. **Avaliação da composição química, atividade antioxidante, antibacteriana, antinoceptiva, antiinflamatória e toxicidade do extrato metanólico e frações de folhas de *Spondias* sp.** (Anacardiaceae). Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), 2012.

SOKOTO, M. A.; SINGH, R.; KRISHNA, B. B.; KUMAR, J.; BHASKAR, T. Non-isothermal kinetic study of de-oiled seeds cake of African star apple (*Chrosophyllum albidum*) using thermogravimetry. **Heliyon**, v. 2, n. 10, p. e00172, out. 2016.

SOLÓRZANO-SANTOS, F.; MIRANDA-NOVALES, M. G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 136–141, abr. 2012.

SOLTANBEIGI, A. Qualitative Variations of Lavandin Essential Oil under Various Storage Conditions. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 23, n. 6, p. 1237–1252, 1 nov. 2020.

SOUZA, E. O.; SILVA, N. F.; RODRUGUES, F. F. G.; CAMPOS, A. R.; LIMA, G. S.; COSTA, J. G. M. Chemical composition and resistance-modifying effect of the essential oil of *Lantana camara* linn. **Pharmacognosy Magazine**, v. 6, n. 22, p. 79, 2010.

TRIFAN, A.; LUCA, S. V.; GREIGE-GERGES, H.; MIRON, A.; GILLE, E.; APROSTOSOAIIE, A. C. Recent advances in tackling microbial multidrug resistance with essential oils: combinatorial and nano-based strategies. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 338–357, 2020.

VARONA, S.; KARETH, S.; MANTIN, A.; COCERO, M. J. Formulation of lavandin essential oil with biopolymers by PGSS for application as biocide in ecological agriculture. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 54, n. 3, p. 369-377, 2010.

VAN DE VEL, E.; SAMPERS, I.; RAES, K. A review on influencing factors on the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 3, p. 357–378, 4 fev. 2019.

VAN VUUREN, S. F.; SULIMAN, S.; VILJOEN, A. M. The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 440–446, abr. 2009.

VOON, H. C.; BHAT, R.; RUSUL, G. Flower Extracts and Their Essential Oils as Potential Antimicrobial Agents for Food Uses and Pharmaceutical Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 11, n. 1, p. 34–55, jan. 2012.

ZHANG, L.-L.; YANG, Z; FAN, G.; REN, J.; YIN, K. J.; PAN, S. Antidepressant-like Effect of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Essential Oil and Its Main Component Limonene on Mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 50, p. 13817–13828, 18 dez. 2019.