

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE DE
TERPENÓIDES

CRISTIANE MENEGOTTO TOSCAN

Caxias do Sul

2010

CRISTIANE MENEGOTTO TOSCAN

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE DE
TERPENOIDES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à
obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora Profa. Dra. Ana Paula Longaray Delamare

Co-orientadores Profa. Dra. Mirian Salvador

Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray

Caxias do Sul

2010

CRISTIANE MENEGOTTO TOSCAN

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE DE TERPENOIDES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Longaray Delamare

Co-orientadora: Profa. Dra. Mirian Salvador

Co-orientador: Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 09 DE DEZEMBRO DE 2010.

Comissão examinadora:

Profa. Dra. Lessandra Michelin

Prof. Dr. Anderson Miyoshi

Prof. Dr. Diego Bonatto

Dedico este trabalho ao meu pai, à minha mãe, ao meu irmão e ao Alfredo.

Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, em especial:

A Deus pela vida e por me acompanhar em todos os momentos, me dando força e coragem para superar todos os desafios.

Aos meus pais, Luiz e Elisa, e ao meu irmão Fabricio pela paciência e pelo amparo nos momentos difíceis. Amo muito vocês.

Ao Alfredo, meu namorado de tantos anos por ter acreditado em mim desde o princípio e por ter me mostrado que a felicidade plena é uma coisa simples e fácil de ser alcançada.

Às minhas nonas Terezinha Motter Menegotto e Olinda Mascarello Toscan, por serem um exemplo na minha vida.

Aos meus familiares e amigos, pela motivação.

À Dra. Ana Paula Longaray Delamare, pela oportunidade, pelo auxílio na realização deste trabalho e pela amizade.

Aos meus co-orientadores Dra. Mirian Salvador e Dr. Sergio Echeverrigaray, por toda a ajuda e incentivo.

Aos professores Dr. Maurício Moura da Silveira e Dr. Diego Bonatto pelo acompanhamento deste trabalho.

À Carolina Maria de Oliveira Nunes, acima de tudo minha amiga, pela confiança e apoio incondicional.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia Vegetal e Microbiologia Aplicada, desta Universidade, por terem me acolhido de maneira fraterna.

Aos colegas do Laboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidantes, desta Universidade, que sempre deram total apoio a este trabalho me auxiliando nos testes de antioxidantes.

Aos professores, funcionários e colegas do curso de Mestrado do Instituto de Biotecnologia.

À Universidade de Caxias do Sul e ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, dos quais eu tenho orgulho de fazer parte.

À CAPES pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	IX
LISTA DE QUADROS	X
LISTA DE FIGURAS	XI
RESUMO	XIV
ABSTRACT	XV
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Óleos essenciais e terpenos	3
2.2. Atividade antimicrobiana de terpenoides	9
2.3. Atividade antioxidante de terpenoides	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 . Terpenos utilizados	14
3.2. Linhagens microbianas utilizadas para a avaliação da atividade antimicrobiana de terpenoides	14
3.3. Determinação da dose inibitória 50% (DI50) e da concentração inibitória mínima (CIM).....	15
3.4. Avaliação da viabilidade celular	17
3.5. Determinação da inibição da respiração microbiana por terpenoides.....	18
3.6. Determinação da morte celular microbiana	19
3.7. Avaliação da lise celular causada por terpenoides e determinação da perda de componentes celulares.....	19
3.8. Atividade Antioxidante	20
3.9. Análise Estatística	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1 Dosagem inibitória 50% (DI50) de terpenoides sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.....	22
4.2. Dosagem inibitória 50% (DI50) de terpenoides sobre leveduras.....	24
4.3. Concentração inibitória mínima (CIM) de terpenoides sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas	25
4.4. Concentração inibitória mínima (CIM) para leveduras.....	33
4.5. Avaliação da viabilidade microbiana na presença de citral e geraniol	35
4.6. Inibição de respiração microbiana por terpenoides.....	42

4.7 Morte celular microbiana, lise celular e perda de componentes celulares causadas por terpenoides.	46
4.8 Atividade antioxidante de terpenoides	52
5. CONCLUSÕES.....	55
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estudos mostrando a ação de diferentes compostos sobre microrganismos.	11
Tabela 2. Dose Inibitória 50% (DI50) dos terpenoides (médias \pm desvio padrão) ($\mu\text{L}/\text{mL}$). ..	26
Tabela 3. Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos terpenoides (médias \pm desvio padrão) ($\mu\text{L}/\text{mL}$).....	27
Tabela 4. Percentual de redução do radical DPPH [•] e valor de IC50 ^{**} para os terpenoides.	53
Tabela 5. Percentual de sobrevivência de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> diante de citral e citronelal.....	54









LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Leveduras utilizadas para avaliação da atividade antimicrobiana.	14
Quadro 2. Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas utilizadas para avaliação da atividade antimicrobiana.....	15

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Ciclo biossintético dos metabólitos secundários (adaptado de Simões *et al.* 2001)... 4
- Figura 2. Estrutura química de citronelal, citronelol, 1,8-cineol, α -terpineol, citral, geraniol e β -cariofileno..... 7
- Figura 3. Esquema representativo do teste de diluições seriadas realizado para a determinação da dose inibitória 50% (DI50) e da concentração inibitória mínima (CIM)..... 16
- Figura 4. Concentração inibitória mínima de citral (1), geraniol (2), citronelal (3), citronelol (4), 1,8-cineol (5), α -terpineol (6) e β -cariofileno (7) de bactérias Gram-positivas. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). 31
- Figura 5. Concentração inibitória mínima de citral (1), geraniol (2), citronelal (3), citronelol (4), 1,8-cineol (5), α -terpineol (6) e β -cariofileno (7) de bactérias Gram-negativas. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). 31
- Figura 6. Concentração inibitória mínima de citral (1), geraniol (2), citronelal (3), citronelol (4), 1,8-cineol (5), α -terpineol (6) e β -cariofileno (7) diante de leveduras. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). 35
- Figura 7. Inibição do crescimento das bactérias Gram-positivas *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Listeria monocytogenes* por citral (■) e geraniol (●). Controle sem adição de terpenóide (o) 37
- Figura 8. Inibição do crescimento de *Escherichia coli*, *Acinetobacter sp.*, *Klebsiella sp.*, *Serratia sp.*, *Shigella sp.* e *Proteus mirabilis* por citral (■) e geraniol (●). Controle sem adição de terpenóide (o) 38
- Figura 9. Inibição do crescimento de *Salmonella typhimurium*, *Salmonella sp.*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* e *Pseudomonas fluorescens* por citral (■) e geraniol (●). Controle sem adição de terpenóide (o) 39
- Figura 10. Inibição do crescimento de *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas ichtiosmia*, *Aeromonas media* e *Aeromonas sobria* por citral (■) e geraniol (●). Controle sem adição de terpenóide (o) 40

- Figura 11. Inibição do crescimento de *Saccharomyces cereviasae*, *Candida albicans*, *Pichia guilliermondii*, *Candida sake*, *Candida guilliermondii* e *Candida utilis* por: citral (■) e geraniol (●). Controle sem adição de terpenóide (o) 41
- Figura 12. Índice relativo de respiração (%) de *Candida albicans*, na presença dos terpenoides citral ■ , citronelal □ , citronelol ■ e geraniol ■ , nas concentrações correspondentes a controle (sem adição de tepenoides), 0,1, 0,5 e 1 CIM. Ao controle foi adicionado triton X-100 0,1%. Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). 43
- Figura 13. Índice relativo de respiração (%) de *Saccharomyces cerevisiae*, na presença dos terpenoides citral ■ , citronelal □ , citronelol ■ e geraniol ■ , nas concentrações correspondentes a controle (sem adição de tepenoides), 0,1, 0,5 e 1 CIM. Ao controle foi adicionado triton X-100 0,1%. Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). 44
- Figura 14. Índice relativo de respiração (%) de *Salmonella typhimurium* na presença dos terpenoides citral ■ e citronelal □ , nas concentrações correspondentes a controle (sem adição de tepenoides), 0,1, 0,5 e 1 CIM. Ao controle foi adicionado triton X-100 0,1%. Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). 45
- Figura 15. Índice relativo de respiração (%) de *Staphylococcus aureus*, na presença dos terpenoides citral ■ e citronelal □ , nas concentrações correspondentes a controle (sem adição de tepenoides), 0,1, 0,5 e 1 CIM. Ao controle foi adicionado triton X-100 0,1%. Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). 46
- Figura 16. Percentual de células viáveis de *Candida albicans* (A) e *Saccharomyces cerevisiae* (B), tratadas com o valor correspondente a concentração inibitória mínima de citral ▨, citronelal □, geraniol ■ e citronelol ■. As médias \pm desvio padrão para triplicata são ilustradas. Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). 48

- Figura 17. Avaliação de lise celular de *Candida albicans* (A) e *Saccharomyces cerevisiae* (B), induzida por citral , citronelal , geraniol  e citronelol , em função do tempo. Dados expressos em percentagem em relação à DO_{600nm} do tempo 0. As médias ± desvio padrão para triplicata são ilustradas. *Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). 50
- Figura 18. Perda de componentes celulares de *Candida albicans* (A) e *Saccharomyces cerevisiae* (B), tratadas com o valor correspondente a concentração inibitória mínima de citral , citronelal , geraniol  e citronelol . As médias ± desvio padrão para triplicata são ilustradas. Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). 52
- Figura 19. Percentual de sobrevivência da levedura *Saccharomyces cerevisiae* tratada com peróxido de hidrogênio 50 mM, citral 0,0025 $\mu\text{L}/\text{mL}$ + H₂O₂ 50 mM e citronelal 0,015 $\mu\text{L}/\text{mL}$ + peróxido de hidrogênio 50 mM. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). 54

RESUMO

Terpenos são compostos que fazem parte da constituição de óleos essenciais. Estes compostos são formados pela condensação de unidades de isopreno e quando contêm oxigênio são denominados terpenoides. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana e antioxidante dos terpenoides citral, citronelal, citronelol, 1,8-cineol, geraniol, α -terpineol e do sesquiterpeno β -cariofileno. Para tanto, as concentrações inibitórias mínimas (CIM) e as doses inibitórias 50% (DI50) foram determinadas através do método de diluição seriada (0 a 10 μ L/mL v/v) em microplacas. A viabilidade celular, na concentração inibitória mínima, foi avaliada por plaqueamento e contagem. Foi avaliado também o efeito dos terpenoides sobre a respiração de bactérias e leveduras. Além disso, testes específicos envolvendo citral, citronelal, citronelol e geraniol foram realizados com as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans*, sendo eles: avaliação da sobrevivência, lise celular e perda de componentes celulares. A atividade antioxidante *in vitro* dos terpenoides foi determinada pelo método DPPH[•] (1,1-difenil 2-picrilhidrazil). A atividade antioxidante *in vivo* de citral e citronelal foi realizada utilizando *S. cerevisiae* como organismo modelo. Os resultados mostraram que os seis terpenoides e sesquiterpeno têm atividade antimicrobiana, com variação entre as concentrações destes isolados e o tipo de microrganismo avaliado. De um modo geral, o citral foi o terpenoide que exibiu ação antimicrobiana mais expressiva, enquanto o β -cariofileno afetou um número restrito de microrganismos. A presença de citral e citronelal, nas concentrações inibitórias mínimas correspondentes, reduziu a respiração de *Salmonella typhimurium* e *Staphylococcus aureus*. *C. albicans* e *S. cerevisiae*, quando tratadas com CIM de citral, citronelal, citronelol e geraniol, tiveram a respiração inibida. Geraniol foi o terpenoide com maior atividade microcida sobre *C. albicans*. Citral, citronelol, citronelal e geraniol induziram a perda de componentes celulares tanto em *C. albicans* quanto em *S. cerevisiae*. Todos os compostos mostraram atividade antioxidante *in vitro*, particularmente o citral. Por outro lado, citronelal foi o único terpenoide que apresentou atividade antioxidante *in vivo*, sobre células eucarióticas. De uma maneira geral, o presente trabalho mostrou que o citral apresenta importante atividade antioxidante e antimicrobiana, induzindo a perda de componentes celulares e inibindo a respiração. Estas informações são importantes para aplicações farmacológicas deste composto ou óleos essenciais com elevada concentração de citral.

Palavras-chave: terpenoides, atividade antimicrobiana, atividade antioxidante.

ABSTRACT

Terpenes are the main constituents of plant essential oils. These compounds are formed by the condensation of isoprene units, and when contain oxygen are named terpenoids. The present work aimed to evaluate the antimicrobial and antioxidant activity of terpenoids citral, citronellal, citronellol, 1,8-cineole, geraniol, α - terpineole and sesquiterpene β -caryophyllene. Thus for, the minimal inhibitory concentrations (MIC), and the inhibitory dosage 50% (ID50) were determined using the microplate serial dilution method (0 to 10 μ L/mL v/v). Cell viability at the MIC concentration was evaluated by plating and counting. The effect of terpenoids on bacterial and yeast respiration was evaluated. Moreover, the following specific tests were developed on *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* using citral, citronellal, citronellol and geraniol: cell viability, cellular lysis, and loss of cellular components. The *in vitro* antioxidant activity of the terpenoids was determined by the DPPH[•] (1,1-difenil 2-picrilhidrazil). assay. *In vivo* antioxidant activity of citral and citronellal was evaluated using *S. cerevisiae* as model organism. The results showed that all the six terpenoids and one sesquiterpene have antimicrobial activity, with variation among terpenoids and microorganisms. In general, citral exhibited the highest antimicrobial activity, where β -cariophyllene affects a restricted number of organisms. The presence of citral and citronellal at their MICs reduced respiration of *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. Respiration inhibitory activity of citral, citronellol, citronellal and geraniol was also evidenced on *C. albicans* and *S. cerevisiae*. Geraniol was the terpenoid with the highest microcide activity on *C. albicans* and *S. cerevisiae*, as determined by the methylene blue staining method. Citronellal and citronellol exhibited low lytic activity on *S. cerevisiae*, but not on *C. albicans*. Citral, citronellol, citronellal and geraniol induced the loss of cellular components in both *C. albicans* and *S. cerevisiae*. All the compounds showed *in vitro* antioxidant activity, particularly citral. Conversely, citronellal was the only terpenoid with *in vivo* antioxidant activity on eukaryotic cells. In general, the present work showed that citral has an important antioxidant and antimicrobial activity, inducing the loss of cellular components and inhibiting cell respiration. These informations are important for the pharmacological application of this compound or essential oils with high concentration of citral.

Key words: terpenoids, antimicrobial activity, antioxidant activity.

1. INTRODUÇÃO

Óleos essenciais são misturas de um número variável de substâncias orgânicas, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Dentre os inúmeros constituintes destes óleos, encontram-se os terpenos e terpenoides. Os terpenos são formados pela condensação de unidades de isopreno (C₅), podendo se apresentar na forma de monoterpenos, sesquiterpenos, triterpenos e seus derivados oxigenados (terpenoides). Estes compostos apresentam baixa probabilidade de geração ou seleção de resistentes, devido à sua complexidade química e forma de ação, e são extremamente comuns na natureza. Além disso estes compostos são, de um modo geral, considerados GRAS (*Generally Regarded as Safe*).

A utilização de produtos naturais como agentes de controle microbiano não atrai somente a área de alimentos, por prevenir sua contaminação e deterioração, mas também a área farmacêutica, uma vez que patógenos associados a doenças infecciosas estão se tornando resistentes às drogas utilizadas. Nesse sentido, a ampla atividade biológica dos óleos essenciais tem levado à avaliação de óleos de distintas plantas; porém, poucos trabalhos mostram a atividade antimicrobiana de compostos isolados. Sabe-se que os óleos essenciais e alguns terpenos atuam sobre a membrana celular microbiana, provocando alterações que levam à perda de componentes celulares. Esta desestruturação da membrana tem sido atribuída às características lipofílicas dos terpenos. Por outro lado, este mecanismo não explica a grande diferença observada na atividade antimicrobiana de diferentes óleos com composição semelhante ou com componentes majoritários de estrutura similar.

O Laboratório de Biotecnologia Vegetal e Microbiologia Aplicada tem trabalhado com atividade antimicrobiana de diversos óleos essenciais de plantas, como por exemplo: *Cunila galioides* (citrál), *Cunila galioides menteno* (mentha-trans-2,8-dienol, limoneno, trans-ocimeno), *Cunila incisa* (1,8-cineol, α -terpineol), *Cunila spicata* (1,8-cineol, α -terpineol), *Cunila menthoides* (menteno), *Cunila angustifolia* (sabineno,

terpineno), *Cunila microcephala* (mentofurano), *Salvia officinallis* (α -thujona, 1,8-cineol, cânfora, borneol e β -pinene), *Salvia triloba* (α -thujone, 1,8-cineol, cânfora e β -cariofileno), sendo que a resposta óleo versus microrganismos é dependente da composição do óleo e do tipo de microrganismos.

Assim sendo, o presente trabalho teve como objetivo compreender os mecanismos de ação individuais de seis terpenoides e de um sesquiterpeno e conseqüentemente prever os óleos essenciais com atividades biológicas específicas para posterior utilização em produtos comerciais. Para tanto, foram utilizados os terpenoides citral, citronelal, citronelol, 1,8-cineol, geraniol, α -terpineol e o sesquiterpeno β -cariofileno, para os quais foram determinadas as concentrações inibitórias mínimas (CIM), dose inibitória 50% (DI50) e a mortalidade de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras, além da viabilidade celular. Além disso, foram avaliados os efeitos de um conjunto de terpenoides sobre a respiração, morte celular, lise e perda de componentes celulares em leveduras. Para aumentar a aplicabilidade em produtos biotecnológicos, os terpenoides foram avaliados quanto a sua atividade antioxidante.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Óleos essenciais e terpenos

Os produtos da síntese de compostos essenciais para a sobrevivência das espécies vegetais são chamados de metabólitos primários. Nesse grupo estão incluídas macromoléculas como lipídeos, carboidratos, ácidos nucleicos e proteínas com funções vitais bem definidas. Os produtos do metabolismo primário, através de diversas rotas biossintéticas, originam, à custa de energia, o segundo grupo de compostos químicos: os metabólitos secundários ou micromoléculas (Simões *et al.* 2001).

O metabolismo secundário das plantas superiores é capaz de produzir compostos que geralmente apresentam estrutura complexa, baixo peso molecular e marcantes atividades biológicas que diferentemente dos produtos do metabolismo primário, são encontrados em concentrações relativamente baixas e em determinados grupos de plantas. O fato do vegetal utilizar rotas biossintéticas elaboradas, com elevados gastos de energia, conduz à hipótese mais aceita atualmente de que os vegetais consomem essa energia para sintetizar compostos necessários para a sua sobrevivência e preservação, sendo que esses produtos atuam principalmente na defesa do vegetal. Essas substâncias apresentam, principalmente, as funções de atração de insetos polinizadores e de defesa contra insetos-praga, fungos, bactérias e nematóides, e, dentre estes compostos, encontram-se os óleos essenciais (Bakkali *et al.* 2008).

Os compostos secundários, provenientes do metabolismo secundário, são originários de duas rotas metabólicas intermediárias que são derivadas da glicose: a do ácido chiquímico e a do acetato (Figura 1). O ácido chiquímico é precursor de taninos hidrolisáveis, cumarinas, alcaloides derivados dos aminoácidos aromáticos e fenilpropanoides, compostos que têm em comum a presença de um anel aromático na sua composição, ao passo que os derivados do acetato são aminoácidos alifáticos e os alcaloides derivados dele são terpenoides, esteroides, ácidos graxos e triglicerídeos

(Bakkali *et al.* 2008). Isso quer dizer que as plantas são capazes de sintetizar substâncias aromáticas, sendo que a maior parte delas são estruturas fenólicas e terpenoides, das quais pelo menos 12.000 foram isoladas. Este número, segundo estimativas, deve representar somente 10% do total existente. Segundo Cowan (1999), os terpenoides são os compostos responsáveis pelo aroma das plantas.

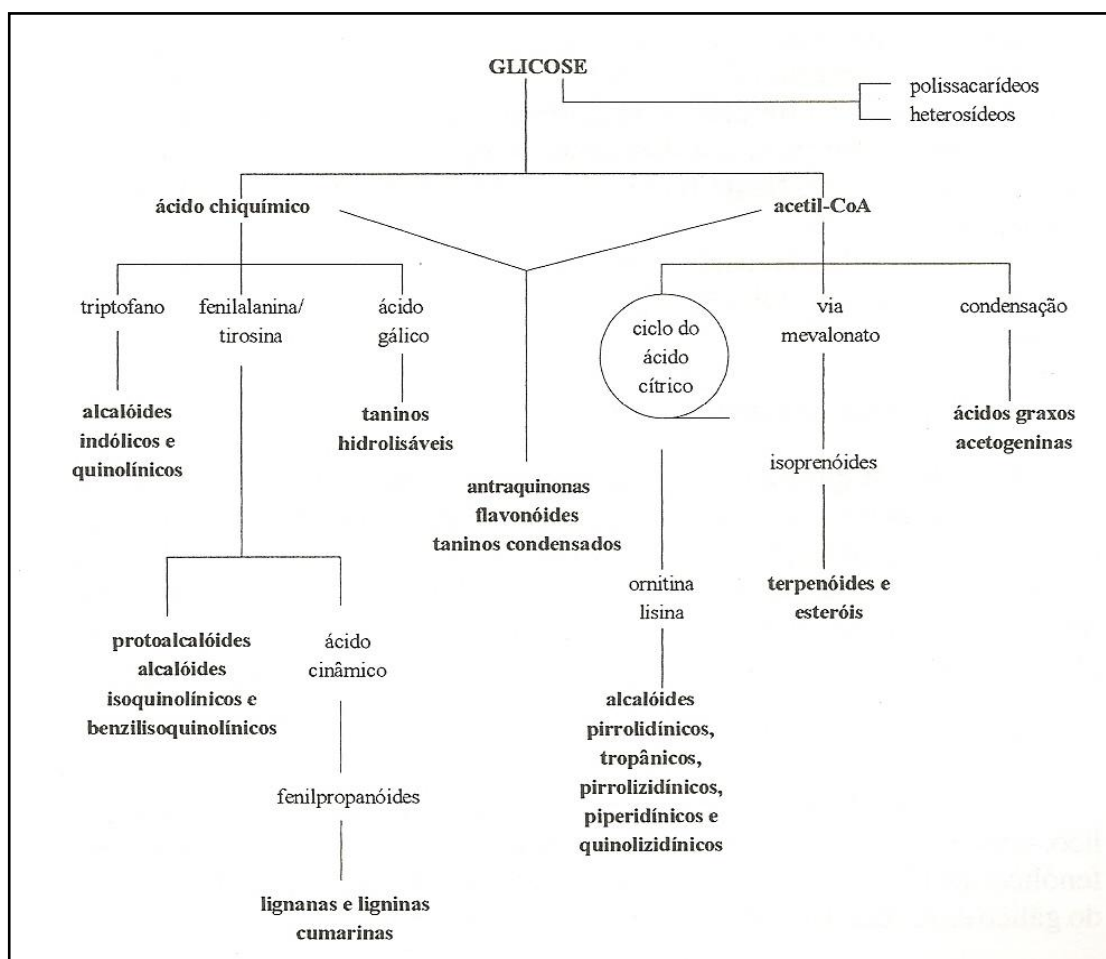


Figura 1. Ciclo biossintético dos metabólitos secundários (adaptado de Simões *et al.* 2001).

Os óleos essenciais são produtos do metabolismo secundário das plantas, variando em intensidade e composição de acordo com a espécie, variabilidade genética e fatores ambientais, sendo geralmente específicos para determinados órgãos e característicos para o estágio de desenvolvimento da planta. Também conhecidos como óleos voláteis, óleos etéreos ou simplesmente essências, são definidos pela International Standard Organization (ISO) como produtos obtidos de partes da planta, através da destilação por arraste com vapor d'água. São misturas complexas de substâncias

voláteis, lipofílicas, instáveis à temperatura ambiente e à luz, geralmente odoríferas e líquidas (Simões *et al.* 2001).

Outras características que podem ser identificadas nos óleos essenciais são: o sabor é geralmente acre (ácido) e picante; quando recentemente extraídos, são geralmente incolores ou ligeiramente amarelados, poucos sendo aqueles que apresentam cor, como o óleo volátil de camomila, que tem coloração azulada; normalmente, são instáveis, principalmente na presença de ar, luz, calor, umidade, metais, e a maioria dos óleos essenciais possui índice de refração e são opticamente ativos, propriedades estas usadas em sua identificação e controle de qualidade (Dorman & Deans, 2000).

De acordo com Simões & Spitzer (2000), os óleos essenciais são geralmente produzidos por estruturas secretoras especializadas, tais como glândulas, células parenquimáticas diferenciadas, canais oleíferos ou em bolsas específicas. Tais estruturas podem estar localizadas em algumas partes específicas ou em toda a planta. Assim, os óleos essenciais podem ser encontrados na parte aérea, como na menta, nas flores, como é o caso da rosa e do jasmim, nas folhas, como ocorre nos eucaliptos e no capim-limão, nos frutos, como na laranja e no limão, na madeira, como no sândalo e no pau-rosa, no caule, como ocorre nas canelas, nas raízes, como se observa no vetiver; nos rizomas, como no gengibre e nas sementes, como na noz moscada.

Grande parte dos compostos presentes nos óleos essenciais apresentam ação anti-inflamatória, pesticida, inseticida, anti-séptica, herbicida, antioxidante, entre outras (Duke, 1994). O mecanismo exato de ação dos óleos essenciais não é conhecido. Sua atividade biológica, porém, pode ser comparada com a atividade de produtos farmacológicos sinteticamente produzidos (Svoboda & Deans, 1995; Baratta *et al.* 1998a,b; Ramzi *et al.* 2008). Em geral, a ação dos óleos é o resultado de efeitos combinados que ativam ou inativam estruturas. Possivelmente, atuam rompendo ou desestruturando as membranas por ação sobre os compostos lipofílicos, causando perda de várias enzimas e nutrientes através da membrana celular (Cowan, 1999; Cox *et al.* 2000).

Os óleos essenciais podem apresentar uma mistura de 20 a 60 componentes em diferentes concentrações, sendo que destes, dois ou três compostos podem ser considerados majoritários por estarem presentes em altas concentrações (20 a 70%). Geralmente, estes componentes majoritários determinam as propriedades biológicas do óleo essencial. Eles incluem dois grupos de distintas origens biossintéticas. O primeiro grupo é formado por terpenos e terpenoides e o segundo grupo por compostos aromáticos alifáticos, ambos de baixo peso molecular (Bakkali *et al.* 2008).

Terpenos são diferentes tanto em estrutura quanto em forma. São formados pela condensação de unidades de isopreno (C5) através da via do acetato-mevalonato e compartilham a sua origem com os ácidos graxos. Eles divergem destes últimos por apresentarem ramificações e estrutura cíclica (Simões *et al.* 1994). Eles são classificados de acordo com o número de unidades presentes no seu esqueleto de carbono. Os terpenos mais comumente encontrados são monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15) e diterpenos (C20) (Bakkali *et al.* 2008). Quando estes compostos contêm elementos adicionais, usualmente oxigênio, são denominados terpenoides. Segundo Zwenger & Basu (2008), existem mais de trinta mil terpenoides identificados.

Os terpenos e terpenoides apresentam funções variadas nos vegetais. Os monoterpenos podem atuar na atração de polinizadores. Os sesquiterpenos, em geral, apresentam funções protetoras contra fungos e bactérias, enquanto que muitos diterpenos dão origem aos hormônios de crescimento vegetal. Os triterpenoides e seus derivados, os esteroides, apresentam uma gama de funções. Muitos têm funções de proteção contra herbívoros, alguns são antimetabólitos e outros atuam na germinação das sementes e na inibição do crescimento da raiz (Holetz *et al.* 2002; Morita *et al.* 2000; El-Sakhawy *et al.* 1998).

Os monoterpenos constituem 90% dos óleos essenciais. São altamente hidrofóbicos e seus efeitos biológicos estão relacionados com interações com a membrana dos microrganismos (Turina *et al.* 2006). Estão relacionados com uma série de funções químicas, tais como álcoois, aldeídos, éteres, entre outras. Da mesma forma

que os monoterpenos, os sesquiterpenos também podem estar associados a funções químicas como carbonetos, álcoois, entre outras (Bakkali *et al.* 2008). Eles são comumente utilizados como componentes de fragrâncias, cosméticos, produtos de limpeza, desinfetantes, aditivos de alimentos e remédios devido aos aromas e propriedades antimicrobianas que possuem (Seo *et al.* 2008; Amaral *et al.* 1998). E por estes motivos, ou seja, devido à sua gama de aplicações biotecnológicas, que os terpenoides vêm chamando a atenção (Zwenger & Basu, 2007).

O monoterpenoide citronelol (Figura 2) é um composto de modelo linear naturalmente presente em plantas cítricas, sendo ele o responsável pela característica flavorizante de algumas frutas. O geraniol (Figura 2), por sua vez, é encontrado em muitas espécies de flores, inclusive rosas, sendo estruturalmente parecido com o citronelol, diferem-se, porém, pela presença de uma ligação dupla adicional (Höschle & Jendrossek, 2005). O geraniol está presente também em tecidos vegetais de muitas ervas. Normalmente, é encontrado juntamente com geranial e neral (isômeros do citral), que são os produtos da oxidação do geraniol (Iijima *et al.* 2004).

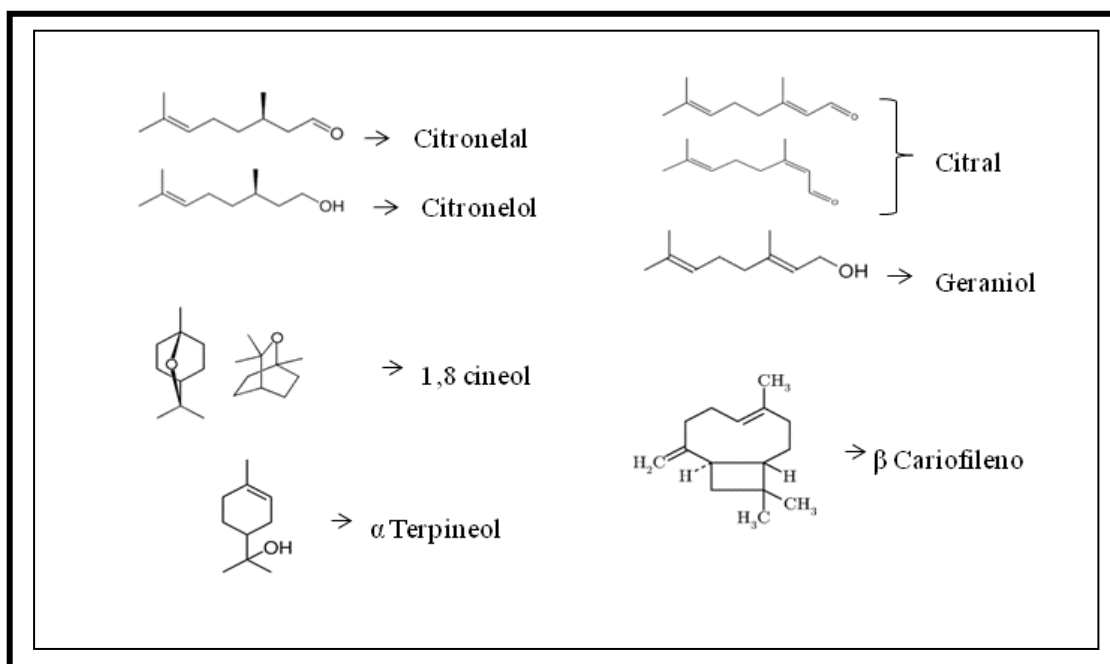


Figura 2. Estrutura química de citronelal, citronelol, 1,8-cineol, α -terpineol, citral, geraniol e β -cariofileno.

Citral (Figura 2) é o nome dado a mistura de dois monoterpenos aldeídos acíclicos isoméricos: geranial (*trans*-citral, citral A) e neral (*cis*-citral, citral B). Normalmente um isômero não consegue ocorrer sem o outro. Devido ao seu aroma de limão, o citral tem grande importância nas indústrias de alimentos e aromas. Ele também é utilizado como matéria prima em indústrias farmacêuticas, de cosméticos e de perfumes (Lewinsohn *et al.* 1998). Segundo Belletti *et al.* (2007), o citral é considerado uma das moléculas mais interessantes por apresentar capacidade antimicrobiana.

O α -terpineol (Figura 2) é o composto majoritário de muitas plantas utilizadas em medicina popular e aromaterapia (Moreira *et al.* 2001). Já o 1,8-cineol (Figura 2) (eucaliptol) é o monoterpenoide presente em eucaliptus entre outras plantas. Este composto é normalmente utilizado no tratamento de sintomas de doenças respiratórias exacerbadas por infecção e em aromaterapia (Santos *et al.* 2004). Além disso, Santos & Rao (2001) relataram que 1,8-cineol atua, através de doses orais variando de 50 a 200 mg/Kg, na prevenção de danos gástricos induzidos por etanol.

Assim como os terpenoides descritos anteriormente, o citronelal (Figura 2) é encontrado em grandes concentrações em plantas tais como a citronela (Flores *et al.* 2009). O β -cariofileno (Figura 2) é um exemplo de sesquiterpeno presente no óleo de copaíba (Ramos, 2006).

As muitas ervas aromáticas ou temperos que são utilizados para acrescentar aroma e sabor especiais aos alimentos e ao mesmo tempo apresentam propriedades antimicrobianas incluem alho, cebola, canela, curry, mostarda, pimenta-do-reino, tomilho e orégano, dentre outros (Conner & Beuchat, 1984; Deans *et al.*, 1992; Deans & Ritchie, 1987; Smith-Palmer *et al.*, 1998; Svoboda & Deans, 1995; Aureli *et al.*, 1992; Tassau *et al.*, 2000; Tepe *et al.*, 2004; entre outros). Naturalmente, sua atividade depende do tipo, da composição e da concentração de óleos essenciais na erva aromática. Também se deve levar em conta a composição do substrato, o processo e as condições de armazenamento, além do tipo e da concentração do microrganismo. (Skandamis & Nychas, 2000).

2.2. Atividade antimicrobiana de terpenoides

Os agentes antimicrobianos isolados das plantas superiores podem agir como reguladores do metabolismo intermediário, ativando ou bloqueando reações enzimáticas, afetando diretamente uma síntese protéica em nível nuclear ou ribossomal, ou mesmo alterando estruturas de membranas (Singh & Shukla, 1984).

Os efeitos de monoterpenoides sobre o crescimento microbiano foram estudados primeiramente com o intuito de determinar a utilização destes componentes na prevenção de crescimento de microrganismos na indústria de alimentos (Amaral *et al.* 1998). A contaminação e deterioração dos alimentos comprometem sua qualidade e segurança, gerando assim grandes custos financeiros para as empresas (Bajpai *et al.* 2009). Sendo assim, a utilização de compostos antimicrobianos naturais tem atraído as indústrias deste ramo, já que surgem como alternativa para o controle microbiano (Kobilinsky *et al.* 2007).

A utilização de produtos naturais ou seus derivados como agentes de controle de populações microbianas atrai também a indústria farmacêutica, já que os patógenos associados a doenças infecciosas estão cada dia mais resistentes às drogas tradicionalmente utilizadas em práticas clínicas (Mesa-Arango *et al.* 2009). As bactérias têm capacidade genética de adquirir e transmitir resistência às drogas utilizadas como agentes terapêuticos. Este problema vem alcançando proporções preocupantes e diante desta realidade a perspectiva para o uso de antibióticos é indefinida (Amoroso, 2002; Nascimento *et al.* 2000). Devido à sua atuação em células bacterianas, os produtos vegetais podem influenciar fatores de virulência e alterar a capacidade de infecção. Dessa forma, os terpenos e terpenoides poderão ser importantes alternativas para o controle de patógenos em tempo de reemergência de bactérias multirresistentes aos antimicrobianos convencionais (Teplitski *et al.* 2000; Zhang, 2003).

Dentre as plantas aromáticas com atividade antimicrobiana, destacam-se aquelas da família Lamiaceae (Marino *et al.* 2001; Valant-Vetschera *et al.* 2003; Zgórka &

Glowniak, 2001; Delamare *et al.* 2007, Sandri *et al.* 2007). Entre as plantas desta família com atividade antimicrobiana conhecida, estão *Thymus vulgaris* (tomilho), várias espécies de *Salvia*, *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Origanum vulgare* (orégano), *Mentha piperita* (menta) e *Cunila* sp. (poejo), entre outras.

Alguns estudos mostram que monoterpenos apresentam efeitos prejudiciais à membrana celular bacteriana (Tabela 1). Estudos de microscopia eletrônica de *Escherichia coli* revelaram perda de material celular e coagulação de constituintes citoplasmáticos após exposição ao óleo de *Melaleuca alternifolia* (Gustafson *et al.* 1998). O óleo de *Melaleuca alternifolia* também estimula a perda de íons de potássio e a inibição da respiração em *E. coli*, sugerindo ação letal relacionada a dano de membrana citoplásmica (Cox *et al.* 2000). A principal atividade antimicrobiana do óleo de *Melaleuca alternifolia* pode ser atribuída à presença de 4-terpineol (Southwell *et al.*, 1999; Carson *et al.* 2002).

Os componentes de diferentes óleos essenciais também têm sido estudados por possuírem atividades biológicas. Por exemplo, os compostos carbonílicos controlam eficientemente *Staphylococcus*, *Listeria*, *Salmonella* e *Escherichia coli*. Os compostos presentes em extratos etanólicos de aspargos, cenoura e cebolinha, entre outros vegetais isoladamente ou em combinação, também são eficientes no controle de microrganismos (Bowles & Juneja, 1998). Por serem altamente hidrofóbicos, os monoterpenos interagem com a membrana celular dos microrganismos causando danos importantes na membrana a acabam provocando a lise celular (Turina *et al.* 2006)

Vários compostos têm sido testados para interromper o crescimento de *Listeria monocytogenes* em meios de cultivo permitindo a identificação daqueles com atividade antibacteriana, como eugenol (Blaszyk & Holley, 1998; Hao *et al.* 1998 a, b), carvacrol (Kim & Nair, 1995) e 1,8-cineol (Lis-Balchim & Deans, 1997). Mondello *et al.* (2006) mostraram que 1,8-cineol apresenta ação antifúngica contra *Candida albicans*, que é um importante patógeno humano. Da Silva *et al.* (2008) mostraram que o citral apresenta atividade antifúngica diante de *Candida* sp., especialmente espécies de *C. albicans*.

Segundo os autores, o citral parece atuar predominantemente sobre a membrana celular da levedura, causando sua ruptura e provocando a morte celular. Além disso, pode bloquear a síntese de membrana e inibir a germinação dos esporos dos fungos e a respiração celular.

Tabela 1. Estudos mostrando a ação de diferentes compostos sobre microrganismos.

4-terpineol	<i>Escherichia coli</i>	Perda de material celular e coagulação de constituintes citoplasmáticos	Gustafson <i>et al.</i> 1998
4-terpineol	<i>Escherichia coli</i>	Perda de íons de potássio e a inibição da respiração	Cox <i>et al.</i> 2000
Compostos carbonílicos	<i>Staphylococcus, Listeria, Salmonella e Escherichia coli</i>	Controle do crescimento microbiano	Bowles & Juneja, 1998
Eugenol	<i>Listeria monocytogenes</i>	Interrupção do crescimento microbiano	Blaszyk & Holley, 1998 Hao <i>et al.</i> 1998
Carvacrol	<i>Listeria monocytogenes</i>	Interrupção do crescimento microbiano	Kim & Nair, 1995
1,8-cineol	<i>Listeria Monocytogenes</i>	Interrupção do crescimento microbiano	Lis-Balchim & Deans, 1997
1,8-cineol	<i>Candida albicans</i>	Ação antifúngica	Mondello <i>et al.</i> 2006
Citral	<i>Candida sp.</i>	Ação sobre a membrana celular. Bloqueio da síntese de membrana. Inibição da respiração celular.	Da Silva <i>et al.</i> 2008

2.3. Atividade antioxidante de terpenoides

Os antioxidantes são compostos que funcionam como bloqueadores dos processos óxido-redutivos desencadeados pelos radicais livres. Frequentemente, o termo “antioxidante” é implicitamente restrito aos compostos inibidores da lipoperoxidação. Entretanto, podem ser definidos mais amplamente como substâncias que, quando presentes em baixas concentrações (comparadas a outras que oxidam um substrato), previnem significativamente sua oxidação (Halliwell & Gutteridge, 2000). De acordo com Saito *et al.* (2004), os antioxidantes têm a função de capturar os radicais livres para assim inibir a peroxidação lipídica, a modificação de proteínas e os danos no DNA.

Diferentes metodologias têm sido desenvolvidas para obter uma medição, seja qualitativa ou quantitativa, da capacidade antioxidante de diversos compostos, tanto em testes *in vitro* quanto testes *in vivo* utilizando culturas celulares. Dentre os testes *in vitro* existentes, a capacidade de varredura do radical DPPH[•] (1,1-difenil 2-picrilhidrazil) vem sendo cada vez mais utilizada (Spada *et al.* 2008; Dani *et al.* 2009; Scola *et al.* 2010). O DPPH[•] é um radical livre estável que pode ser reduzido por um antioxidante, resultando na perda de coloração que é determinada em 517 nm (Yamaguchi *et al.* 1998; Espín *et al.* 2000; Fukumoto & Mazza, 2000).

Considerando que a atividade antioxidante de um composto é influenciada pelo modelo de estudo (Halliwell & Gutteridge, 2000), costuma-se empregar mais de um tipo de teste. Ensaios *in vivo*, utilizando microrganismos, têm se mostrado adequados na triagem rotineira de vários produtos, por serem rápidos, sensíveis, econômicos e reprodutíveis (Rabello-Gay, 1991). A descrição do ciclo de vida de *Saccharomyces cerevisiae* e o conhecimento das características genéticas básicas, além da facilidade de manipulação, e principalmente, do fato deste microrganismo ser eucarioto, proporcionaram a grande difusão deste sistema biológico como metodologia experimental para estudos da atividade antioxidante (Soares *et al.* 2003; Raspor *et al.* 2005; Spada & Salvador, 2005).

O estudo da atividade antioxidante baseia-se na avaliação do crescimento celular após tratamentos realizados na presença e ausência do composto a ser testado, com a adição de um agente reconhecidamente formador de espécies reativas de oxigênio como, por exemplo, o peróxido de hidrogênio (Soares *et al.* 2003; Spada & Salvador, 2005; Saffi *et al.* 2006).

Alguns estudos previamente realizados avaliaram a atividade antioxidante de monoterpenos. Verificou-se que o citral é capaz de sequestrar o radical livre O₂^{•-} (Rabbani *et al.* 2006) e inibir iNOS (Lee *et al.* 2008). Singh *et al.* (2009) mostraram que os compostos majoritários dos óleos essenciais de folhas de *Eucalyptus tereticornis*, dentre eles citronelal e citronelol, apresentam atividade antioxidante 35% inferior à

capacidade antioxidante do óleo. Já os terpenoides geraniol e 1,8-cineol mostraram resultados contraditórios em relação a sua atividade antioxidante (Sadlon & Lamson, 2010; Tiwari & Kakkar, 2009; Perry *et al.* 2001; Kordali *et al.* 2005).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 . Terpenos utilizados

No presente trabalho, foram utilizados os seguintes terpenoides: citral (95%, mistura cis e trans, Acros Organic®), geraniol (99%, Acros Organic®), 1,8 cineol (99%, Acros Organic®), α -terpineol (99%, Acros Organic®), citronelal (93%, Acros Organic®), citronelol (95%, Acros Organic®) e o terpeno β -cariofileno (95%, Acros Organic®). Para a homogeneização e dispersão dos monoterpenoides e sesquiterpeno foi utilizado Triton X-100 (C₃₄H₆₂O₁₁) (Vetec Química Fina Ltda) 20% v/v.

Estes compostos foram escolhidos por serem normalmente majoritários em grande parte dos óleos essenciais, por apresentarem diferentes grupos funcionais e por possuírem, com exceção do β -cariofileno, estrutura molecular semelhante.

3.2. Linhagens microbianas utilizadas para a avaliação da atividade antimicrobiana de terpenoides

Para a avaliação da atividade antimicrobiana, foram utilizados os microrganismos mostrados nos Quadros 1 e 2. Todos pertencem à coleção do Laboratório de Biotecnologia Vegetal e Microbiologia Aplicada do Instituto de Biotecnologia, da UCS.

Quadro 1. Leveduras utilizadas para avaliação da atividade antimicrobiana.

Microrganismos	Código de identificação	Origem
Leveduras		
<i>Candida albicans</i>	L106	Laboratório de Microbiologia Aplicada – INBI/ UCS
<i>Candida guilliermondii</i>	IZ 1239	Instituto de Zimotécnico USP
<i>Candida pseudotropicalis</i>	IOC 2697	Instituto Oswaldo Cruz
<i>Candida sake</i>	L06	Departamento de Genética – ESALq/USP
<i>Candida utilis</i>	IZ 300	Instituto de Zimotécnico USP
<i>Pichia guilliermondii</i>	L08	Departamento de Genética – ESALq/USP
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	XV185-14C	Departamento de Genética, Univ. de Alberta, Canadá

Quadro 2. Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas utilizadas para avaliação da atividade antimicrobiana.

Microrganismos	Código de identificação	Origem
Bactérias Gram-positivas		
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 10876	American Type Culture Collection
<i>Bacillus megatherium</i>	IBBac 103	Laboratório de Microbiologia Aplicada – INBI
<i>Bacillus subtilis</i>	IBBac 101	Laboratório de Microbiologia Aplicada – INBI
<i>Lactococcus lactis</i>	CCT 0360	Coleção de Culturas Tropical
<i>Lactobacillus casei</i>	CCT 0667	Coleção de Culturas Tropical
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19117	American Type Culture Collection
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	American Type Culture Collection
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228	American Type Culture Collection
Bactérias Gram-negativas		
<i>Acinetobacter</i> sp	ATCC 1870	American Type Culture Collection
<i>Aeromonas hydrophila</i>	ATCC 7966	American Type Culture Collection
<i>Aeromonas sóbria</i>	ATCC 43979	American Type Culture Collection
<i>Aeromonas ichthiosmia</i>	ATCC 49904	American Type Culture Collection
<i>Aeromonas media</i>	ATCC 33907	American Type Culture Collection
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	American Type Culture Collection
<i>Enterobacter cloacae</i>	IBEnt101	Lab. Microbiologia Bloco S/UCS
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 15048	American Type Culture Collection
<i>Klebsiella</i> sp.	IBKle101	Laboratório de Microbiologia Aplicada – INBI
<i>Proteus mirabilis</i>	L68	Universidade de São Paulo (USP)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> M*	IBPseudo 103	Laboratório de Microbiologia Aplicada – INBI
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NM**	IBPseudo 102	Laboratório de Microbiologia Aplicada – INBI
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ATCC 4973	American Type Culture Collection
<i>Pseudomonas</i> sp.	IBPseudo 101	Laboratório de Microbiologia Aplicada – INBI
<i>Salmonella</i> sp.**	ATCC 14028	American Type Culture Collection
<i>Salmonella typhimurium</i> ***	ATCC 6539	American Type Culture Collection
<i>Serratia</i> sp.	IBSer101	Laboratório de Microbiologia Aplicada – INBI
<i>Shigella</i> sp.	IBShi101	Laboratório de Microbiologia Aplicada – INBI/UCS

* *Pseudomonas aeruginosa* mucóide.

** *Pseudomonas aeruginosa* não mucóide.

***ATCC 14028 e ATCC 6539 pela nova classificação são denominadas *S. enterica* var. *enterica*, mas para fins do trabalho foi adotada a classificação anterior.

3.3. Determinação da dose inibitória 50% (DI50) e da concentração inibitória mínima (CIM)

A dose inibitória 50% (DI50) corresponde à concentração do terpenoide ou do terpeno ($\mu\text{L}/\text{mL}$) capaz de inibir 50% do crescimento microbiano. A concentração inibitória mínima (CIM), por sua vez, corresponde à concentração do terpenoide ou do terpeno ($\mu\text{L}/\text{mL}$) capaz de inibir 90% do crescimento microbiano.

A determinação da dose inibitória 50% (DI50) e da concentração inibitória mínima (CIM) para cada um das bactérias do Quadro 2 (exceto bactérias lácticas) foi realizada através do teste de diluições seriadas dos terpenoides e do terpeno, baseada no

método descrito por Elsom & Hide (1999). Conforme pode ser observado na Figura 3, foram colocados 180 µl de caldo Mueller Hinton (Himedia) nos orifícios da primeira linha da placa de cultura de célula e 100µl nas seguintes. Em seguida, foram adicionados 20µl de terpenoide ou terpeno (Solução Base- 100 µL/mL em Triton-X-100 0,1% (v/v)) nos orifícios da primeira linha e realizada diluição seriada de base dois nas linhas subsequentes através da transferência de 100 µL. Estas diluições corresponderam a concentrações finais de 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125; 0,1562 e 0 µL/mL de terpenoide ou terpeno. À continuação, foram semeados 5µl da bactéria em fase estacionária de crescimento (aproximadamente 10⁶ UFC). Controles positivos (sem terpenoide ou terpeno) e negativos (não inoculados) foram incluídos em cada placa. Aos controles também foi adicionado triton X-100 na mesma concentração encontrada na solução base. As microplacas foram incubadas a 37°C com agitação por aproximadamente 24 horas.

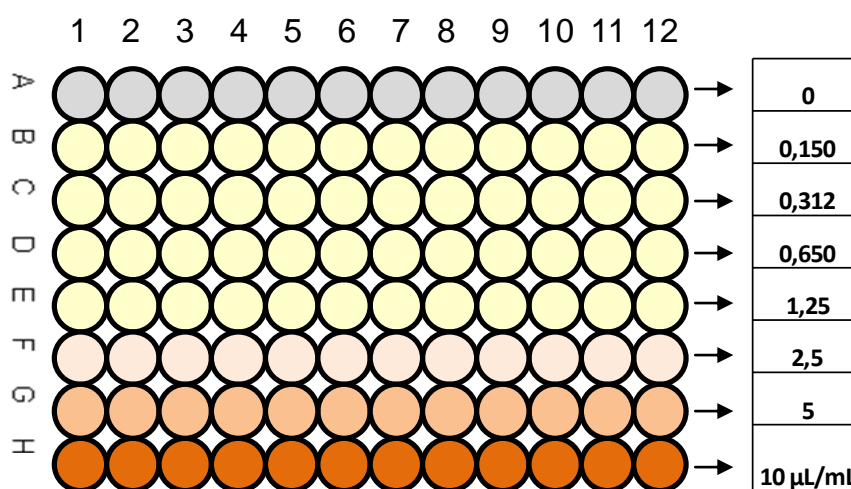


Figura 3. Esquema representativo do teste de diluições seriadas realizado para a determinação da dose inibitória 50% (DI50) e da concentração inibitória mínima (CIM).

Para avaliação da CIM e da DI50 em leveduras e bactérias lácticas (*Lactococcus lactis* e *Lactobacillus casei*) foi empregada a metodologia anterior utilizando meio YEPD (Yeast Extract Peptone Dextrose) (glicose 2%, peptona 2% e extrato de levedura 1%, pH 6,8-7,0) e meio MRS (Himedia), respectivamente.

A leitura de crescimento foi realizada em um leitor de ELISA (Biochrom Libra S12) com comprimento de onda de 595nm. Para cada ensaio foram realizadas três repetições.

Para cálculo da percentagem de inibição, as leituras densitométricas das amostras com o terpenoide ou terpeno foram comparadas com o crescimento na ausência do composto, e expressas na forma de percentagem de crescimento. A DI50 e a CIM para cada microrganismo foi determinada pelo teste estatístico Probit com o auxílio do programa SPSS versão 14.0.

3.4. Avaliação da viabilidade celular

Para avaliar o efeito do radical do terpenoide sobre a viabilidade celular, foram utilizados um terpenoide aldeído (citral) e outro alcoólico (geraniol) nas concentrações obtidas previamente no teste de CIM. Para a realização destes experimentos, foram escolhidos apenas os microrganismos não esporulados cuja CIM foi inferior a 10 µL/mL. Este teste foi baseado em Carson *et al.* (2002), com algumas adaptações na metodologia.

Os microrganismos selecionados foram crescidos por 24 ou 48 horas em meio apropriado: YEPD líquido, específico para leveduras, MRS para bactérias lácticas e caldo Muller Hinton para as demais bactérias. Após o crescimento, a absorbância das amostras foi determinada (595 nm). Na sequência, as amostras foram diluídas com solução salina 0,9% (m/v) ajustando a absorbância para 0,362 (1 na escala de MacFarland). Feita a diluição, os microrganismos foram mantidos por 30 minutos em repouso. Após este período, 900µl da suspensão bacteriana ajustada foram misturados com 100µl da solução base (item 3.3). Como controle negativo, foi utilizado Triton X-100 0,1% (v/v). As amostras dos tratamentos com os terpenoides e respectivos controles foram retiradas no tempo zero, 30, 60 e 180 minutos e imediatamente diluídas e plaqueadas nos meios apropriados segundo o microrganismo avaliado. As placas foram

incubadas a 30°C por 48 horas, no caso de leveduras e bactérias lácticas, e a 37°C por 24 horas, no caso de outras bactérias. Passado o período, foram feitas contagens de unidades formadoras de colônia e os resultados foram expressos em redução do log₁₀ de UFC.

3.5. Determinação da inibição da respiração microbiana por terpenoides

Para avaliação da ação dos terpenoides sobre a respiração microbiana, foram utilizados citral, citronelal, geraniol e citronelol. Os microorganismos empregados neste estudo foram *S. aureus* (ATCC25923) e *S. typhimurium* (ATCC6539), bactérias Gram-positiva e Gram-negativa, respectivamente, e as leveduras *S. cerevisiae* (XV185-14C) e *C. albicans* (L106).

A medida do consumo de oxigênio pelos microrganismos foi realizada com auxílio de oxímetro (Digital Instruments), a temperatura constante de 30 ou 35°C, de acordo com o procedimento descrito por Amaral *et al.* (1998).

Inicialmente, as leveduras e as bactérias foram crescidas em meio apropriado (YEPD líquido ou caldo Muller Hinton) por 24 horas. As suspensões celulares foram ajustadas para absorvância de 3 (625 nm). A um volume de 15 mL, foram adicionados 1 CIM, 0,5 CIM ou 0,1 CIM de citral ou citronelal no caso das bactérias, e de citral, citronelal, geraniol ou citronelol no caso das leveduras. Para cada experimento, foi incluído um controle sem adição de terpenoides. Aos controles também foi adicionado triton X-100 0,1% v/v. As suspensões microbianas foram incubadas por 30 minutos a 30-35°C, sob agitação, para consumo de nutrientes e estabilização da concentração de oxigênio dissolvido. Após este período, adicionaram-se 500µL de glicose 10% (m/v), e imediatamente o eletrodo foi colocado na suspensão. A percentagem de oxigênio dissolvido foi monitorada por 10 minutos. Os resultados foram expressos em índice relativo de respiração.

3.6. Determinação da morte celular microbiana

Para a avaliação da morte celular pelo método de azul de metileno, foi adotada a metodologia de Hammer *et al.* (2004), com algumas adaptações. Primeiramente, as leveduras *S. cerevisiae* (XV185-14c) e *C. albicans* (L106) foram crescidas em meio YEPD líquido, por 24 horas, a 28°C, sob agitação. Após este período, as células foram recuperadas por centrifugação 12000 xg, por 10 minutos, a 20°C, lavadas duas vezes e ressuspensas em água destilada esterilizada na concentração de aproximadamente 10⁷ leveduras/mL, determinada por contagem em câmara de Neubauer, no microscópio, com aumento de 400x. Em seguida, os terpenoides foram adicionados à suspensão de leveduras na concentração inibitória mínima (CIM) de cada terpenoide avaliado. Os tubos foram incubados a 30°C, em repouso, retirando-se amostras nos tempos 30, 60, 90, 120 e 180 minutos. Para avaliação da morte celular, as amostras (80µL) de cada tempo foram acrescidas de 20µL de solução de azul de metileno 0,05% (v/v), agitadas e mantidas em repouso por 5 minutos. As células foram colocadas em câmara de Neubauer e examinadas microscopicamente utilizando um aumento de 400x. O número de células coradas (mortas) e não coradas (vivas) foi determinado. Um mínimo de 400 células foram avaliadas para cada tratamento. Os resultados foram expressos em percentual de células vivas em relação ao controle positivo (células sem tratamento). Para determinação da eficiência do método, foi também incluído, em cada experimento, um controle com células mortas por fervura (5 minutos).

3.7. Avaliação da lise celular causada por terpenoides e determinação da perda de componentes celulares

A perda de componentes celulares e lise celular foi avaliada pelo método descrito por Hammer *et al.* (2004) adaptado. Os terpenoides utilizados foram citral, citronelal, geraniol e citronelol.

Células de *S. cerevisiae* (XV185-14C) e *C. albicans* (L106) foram crescidas em meio YEPD líquido por 24 horas, centrifugadas, lavadas três vezes e ressuspensas em solução salina PBS (0,8% de NaCl, 0,02% de KCl, 0,29% de Na₂HPO₄ e 0,02% de KH₂PO₄, pH 7,4) na concentração de 10⁹ células/mL.

Às suspensões celulares, foi adicionado um volume equivalente a 1 CIM dos terpenoides para *S. cerevisiae* e *C. albicans*. Neste teste, os terpenoides foram diluídos em PBS, acrescido de 0,1% de Tween 80 (PBSTw).

Amostras (1mL) correspondentes aos tempos 0, 1, 2, 4 e 6 horas foram centrifugadas (12000 xg, por 2 min.) e o sobrenadante diluído 10 vezes em PBSTw 0,1% (v/v). A absorbância a 260nm (quantificação da perda de componentes celulares) dos sobrenadantes foi determinada em espectrofotômetro Libra S12 (Biocrom), para avaliação da perda de componentes celulares.

Para determinação de lise celular, as células precipitadas após a centrifugação anterior, foram ressuspensas em 1mL de PBSTw e a sua absorbância foi medida a 600nm em espectrofotômetro Libra S12 (Biocrom).

No caso de citral, devido à sua elevada absorbância em 260 nm, foi necessária a realização de uma extração líquido/líquido (1:1) com acetato de etila, previamente à diluição da fração aquosa e determinação da absorbância a 260nm.

3.8. Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante dos terpenoides citral, citronelal, citronelol, 1,8-cineol, geraniol e α -terpineol foi avaliada pela sua capacidade em doar hidrogênio para DPPH[•] (Rice-Evans *et al.* 1995). Para tanto, 200 μ L das soluções dos diferentes compostos, diluídos em água destilada esterilizada e Triton X-100 20% v/v foram misturados com 800 μ L de uma solução tampão Tris-HCl 100 mM, pH 7,0. A essa mistura, foram adicionados 1000 μ L da solução etanólica de DPPH[•] 500 μ M (Sigma Chem. Co.) e os tubos foram mantidos por 20 minutos ao abrigo da luz. A medida de absorbância foi

feita em espectrofotômetro UV-visível a 517 nm. Nos controles, as amostras as soluções dos diferentes compostos foram substituídas por água destilada. A medida da absorbância do branco corresponde à concentração de DPPH[•] da solução (250 µM). Foram realizadas, no mínimo, três repetições e o resultado foi expresso como capacidade de varredura do radical DPPH[•] e em IC50, ou seja, a quantidade de terpenoide necessária para reduzir 50% do radical livre DPPH[•].

Após o estudo da atividade antioxidante *in vitro*, foram selecionados os terpenoides que apresentaram os melhores resultados *in vitro* para serem testados *in vivo* com a levedura *S. cerevisiae* linhagem XV185-14C (MAT α *ade2-2 arg4-17 his1-7 lys1-1 trp5-48 hom3-10*), cedida pelo Departamento de Genética, Universidade de Alberta, Canadá. Neste teste, 2×10^7 células/mL provenientes de fase estacionária de crescimento foram tratadas com citral e citronelal, nas maiores concentrações não citotóxicas, 0,0025 e 0,015 µL/mL, respectivamente, e com peróxido de hidrogênio (50mM) e incubadas a 28°C por 1 hora, sob agitação, em solução salina. Após, as células foram diluídas em solução de NaCl 0,9 %, semeadas em meio de cultura e incubadas por 48 horas a 28°C. A viabilidade celular foi determinada pela contagem das colônias nas placas, considerando-se o tubo controle (sem tratamento) como 100% de sobrevivência. Os resultados foram expressos pela média de três determinações. A análise dos resultados foi realizada comparando-se os valores percentuais de sobrevivência da levedura *S. cerevisiae* sem tratamento à obtida após a adição de peróxido de hidrogênio (conhecido agente oxidante) e dos terpenoides.

3.9. Análise Estatística

As análises estatísticas dos ensaios (Probit, análises de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey) foram realizadas com o auxílio do programa SPSS versão 14.0

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Dosagem inibitória 50% (DI50) de terpenoides sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 2, a concentração média de citral capaz de reduzir em 50% o crescimento de bactérias Gram-positivas foi $1,77 \pm 0,75$ $\mu\text{L}/\text{mL}$, variando entre $0,41$ $\mu\text{L}/\text{mL}$ (*Bacillus megaterium*) e $2,41$ $\mu\text{L}/\text{mL}$ (*Staphylococcus epidermidis*). No caso das bactérias Gram-negativas, a DI50 média foi de $3,16 \pm 2,83$ $\mu\text{L}/\text{mL}$, variando entre $0,51$ $\mu\text{L}/\text{mL}$ (*Aeromonas ichthiosmia*) e $11,19$ $\mu\text{L}/\text{mL}$ (*Pseudomonas* sp.). As duas linhagens bacterianas de *Pseudomonas* sp. e *Pseudomonas aeruginosa* M testadas apresentaram valores de DI50 superiores às outras espécies de bactérias Gram-negativas avaliadas.

No caso do geraniol (Tabela 2), a DI50 média sobre as bactérias Gram-positivas foi $5,35 \pm 1,01$ $\mu\text{L}/\text{mL}$ variando entre $3,78$ $\mu\text{L}/\text{mL}$ (*Lactococcus lactis*) e $6,77$ $\mu\text{L}/\text{mL}$ (*Staphylococcus aureus*). Já sobre bactérias Gram-negativas, a DI50 média foi de $3,61 \pm 1,17$ $\mu\text{L}/\text{mL}$ com variação entre $1,59$ $\mu\text{L}/\text{mL}$ (*Aeromonas sobria*) e $10,39$ $\mu\text{L}/\text{mL}$ (*Pseudomonas* sp.). *Pseudomonas* sp apresentou DI50 superior às demais representantes do grupo das bactérias Gram-negativas mostrando ser mais resistente ao geraniol. Para o citronelal, a DI50 média sobre as bactérias Gram-positivas foi de $5,07 \pm 1,83$ $\mu\text{L}/\text{mL}$, com variação de $1,72$ $\mu\text{L}/\text{mL}$ para *B. megaterium* e $7,36$ $\mu\text{L}/\text{mL}$ para *S. epidermidis*. A DI50 média sobre as bactérias Gram-negativas avaliadas foi de $5,90 \pm 2,81$ $\mu\text{L}/\text{mL}$, com variação de $1,26$ $\mu\text{L}/\text{mL}$ (*Acinetobacter* sp.) e $10,81$ $\mu\text{L}/\text{mL}$ (*Pseudomonas* sp.).

Com citronelol, a DI50 média sobre as bactérias Gram-positivas foi $5,47 \pm 2,49$ $\mu\text{L}/\text{mL}$, variando entre $1,39$ $\mu\text{L}/\text{mL}$ (*L. casei*) e $7,78$ $\mu\text{L}/\text{mL}$ (*Listeria monocytogenes*). A DI50 média sobre as Gram-negativas foi $7,03 \pm 7,17$ $\mu\text{L}/\text{mL}$, variando entre $0,81$ $\mu\text{L}/\text{mL}$ (*Acinetobacter* sp.) e $33,26$ $\mu\text{L}/\text{mL}$ (*Pseudomonas aeruginosa* NM). Duas bactérias se destacaram por apresentar DI50 inferior às demais: *Acinetobacter* sp. ($0,81$

$\mu\text{L/mL}$) e *A. sobria* (0,85 $\mu\text{L/mL}$). Por outro lado, *P. aeruginosa* M mostrou DI50 muito superior às outras bactérias Gram-negativas (33,26 $\mu\text{L/mL}$).

A DI50 média do 1,8-cineol sobre as bactérias Gram-positivas foi $9,86 \pm 4,13$ $\mu\text{L/mL}$, com variação entre 5,21 $\mu\text{L/mL}$ (*L. lactis*) e 15,86 $\mu\text{L/mL}$ (*L. monocytogenes*). A DI50 média das bactérias Gram-negativas foi $9,47 \pm 7,78$ $\mu\text{L/mL}$ com variação entre 1,13 $\mu\text{L/mL}$ (*Acinetobacter* sp.) e 30,89 $\mu\text{L/mL}$ (*P. aeruginosa* M). *Shigella* sp. e *P. aeruginosa* NM não apresentaram qualquer tipo de redução de crescimento em meio contendo 1,8-cineol.

As bactérias Gram-positivas, em presença de α -terpineol, exibiram DI50 médio igual a $6,20 \pm 3,30$ $\mu\text{L/mL}$, com variação entre 4,21 $\mu\text{L/mL}$ (*L. monocytogenes*) e 13,42 $\mu\text{L/mL}$ (*L. lactis*). Duas espécies apresentaram elevada tolerância ao α -terpineol, sendo elas *L. lactis* e *B. megaterium*. Para esta última, a DI50 foi superior à concentração máxima utilizada nos experimentos. A DI50 média sobre as bactérias Gram-negativas foi $3,25 \pm 3,23$ $\mu\text{L/mL}$. *P. aeruginosa* NM e *Salmonella typhimurium* apresentaram valores de DI50 consideravelmente superiores às demais (11,21 $\mu\text{L/mL}$ e 11,25 $\mu\text{L/mL}$, respectivamente).

Já o composto β -cariofileno, um sesquiterpeno, mostrou uma DI50 média de $7,08 \pm 3,58$ $\mu\text{L/mL}$ sobre bactérias Gram-positivas, variando entre 2,75 $\mu\text{L/mL}$ (*B. megaterium*) e 11,44 $\mu\text{L/mL}$ (*L. monocytogenes*). A DI50 média sobre as bactérias Gram-negativas foi $18,72 \pm 11,71$ $\mu\text{L/mL}$, variando entre 7,03 $\mu\text{L/mL}$ para *Aeromonas media* e 43,24 $\mu\text{L/mL}$ para *Salmonella* sp.. A bactéria Gram positiva *Bacillus cereus*, as bactérias Gram-negativas *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. aeruginosa* NM, *Klebsiella* sp., *S. typhimurium* e *Aeromonas hydrophila* não apresentaram redução de crescimento nas concentrações avaliadas.

4.2. Dosagem inibitória 50% (DI50) de terpenoides sobre leveduras

Conforme mostram os resultados apresentados na Tabela 2, o citral apresentou uma DI50 média de $0,94 \pm 0,63 \mu\text{L}/\text{mL}$ sobre leveduras. Já no caso do geraniol, a DI50 média sobre leveduras foi de $3,06 \pm 2,34 \mu\text{L}/\text{mL}$. Em ambos os casos, *Candida pseudotropicalis* mostrou ser mais susceptível aos terpenoides, apresentando DI50 de 0,04 e $0,001 \mu\text{L}/\text{mL}$, respectivamente. *Candida sake*, por sua vez, exibiu maior tolerância a citral, apresentando DI50 de $1,68 \mu\text{L}/\text{mL}$. *Picchia guillermondii* foi a levedura estudada com maior tolerância a geraniol.

A DI50 média do citronelal sobre leveduras foi de $5,47 \pm 9,70 \mu\text{L}/\text{mL}$ e a DI50 média do citronelol foi $2,28 \pm 1,68 \mu\text{L}/\text{mL}$. Citronelal e citronelol diferem entre si apenas no que diz respeito à suas funções químicas, uma vez que o primeiro é um aldeído e o segundo é um álcool. Porém, em ambos os casos, *C. pseudotropicalis* apresentou os menores valores de DI50 ($0,08$ e $0,09 \mu\text{L}/\text{mL}$, respectivamente). Por outro lado, *P. guillermondii* exibiu maior tolerância ao citronelal do que ao citronelol, com DI50 de $27,34 \mu\text{L}/\text{mL}$ e $5,21 \mu\text{L}/\text{mL}$, respectivamente.

A DI50 média de 1,8-cineol sobre leveduras foi de $5,19 \pm 2,10 \mu\text{L}/\text{mL}$, com uma variação entre $1,08 \mu\text{L}/\text{mL}$ e $7,56 \mu\text{L}/\text{mL}$ para *C. pseudotropicalis* e *Candida albicans*, respectivamente. Os resultados corroboram os encontrados por Mondello *et al.* (2006), cujos valores de DI50 de 1,8-cineol contra diferentes linhagens *C. albicans* iniciam em $4 \mu\text{L}/\text{mL}$. Porém, o valor de DI50 para *Saccharomyces cerevisiae*, $5,88 \pm 0,10 \mu\text{L}/\text{mL}$, é superior ao encontrado por Mondello *et al.* (2006), $4 \mu\text{L}/\text{mL}$. As diferenças entre estes resultados se devem ao fato de se tratarem de microrganismos de linhagens diferentes.

A DI50 de α -terpineol média sobre as leveduras envolvidas neste estudo foi de $2,83 \pm 1,89 \mu\text{L}/\text{mL}$, sendo que, mais uma vez, *C. pseudotropicalis* foi a espécie que apresentou menor DI50 ($0,02 \mu\text{L}/\text{mL}$) e *P. guillermondii* ($6,27 \mu\text{L}/\text{mL}$) a que apresentou a maior DI50.

O terpeno β -cariofileno mostrou uma DI50 média de $7,34 \pm 7,25 \mu\text{L/mL}$, variando entre $0,44 \mu\text{L/mL}$ (*C. pseudotropicalis*) e $19,26 \mu\text{L/mL}$ (*Candida utilis*).

4.3. Concentração inibitória mínima (CIM) de terpenoides sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas

De acordo com a Tabela 3, o citral apresenta CIM de $3,59 \pm 1,94 \mu\text{L/mL}$ sobre bactérias Gram-positivas. Três representantes deste grupo mostraram comportamentos diferentes das demais, exibindo CIM significativamente superior (*L. monocytogenes*, $6,76 \mu\text{L/mL}$) ou inferior (*B. cereus* e *B. megaterium*, $1,28$ e $0,68 \mu\text{L/mL}$, respectivamente) à média. Para bactérias Gram-negativas, o valor de CIM médio foi de $5,22 \pm 4,12 \mu\text{L/mL}$. Neste caso a bactéria mais tolerante ao citral foi *P. aeruginosa* M com uma CIM de $13,77 \mu\text{L/mL}$, seguida por *Pseudomonas* sp. ($13,32 \mu\text{L/mL}$) e *P. aeruginosa* NM ($10,59 \mu\text{L/mL}$). Já a Gram negativa mais sensível ao citral foi *A. ichthiosmia*, cuja CIM foi $0,86 \mu\text{L/mL}$.

Os valores individuais de CIM obtidos no presente trabalho são contrastantes com os apresentados por Onawunmi (1989) e Hayes *et al.* (2002). No caso de *S. aureus*, a CIM obtida ($4,92 \pm 0,22 \mu\text{L/mL}$) foi superior à determinada por Onawunmi (1989) e Hayes *et al.* (2002), $0,3$ a $2 \mu\text{L/mL}$ e $0,5 \mu\text{L/mL}$, respectivamente. Por outro lado, a CIM do citral sobre *P. aeruginosa* variou entre $10,59 \mu\text{L/mL}$ e $13,77 \mu\text{L/mL}$, enquanto Hayes *et al.* (2002) obtiveram um valor de $20 \mu\text{L/mL}$. As diferenças entre os distintos estudos podem ser atribuídas à variação de resposta dependendo da linhagem microbiana utilizada. Esta hipótese é apoiada pela grande diferença de resposta das três linhagens de *P. aeruginosa* avaliadas no presente trabalho, assim como as diferenças encontradas por Hayes *et al.* (2002) em *S. aureus* ($0,3$ a $2 \mu\text{L/mL}$).

Tabela 2. Dose Inibitória 50% (DI50) dos terpenoides (médias \pm desvio padrão) ($\mu\text{L}/\text{mL}$).

	Microrganismos	Citral	Geraniol	Citronelal	Citronelol	1,8-Cineol	α-terpineol	β-cariofileno
Bactérias Gram Positivas	<i>Bacillus cereus</i>	0,81 \pm 0,02 ^{MN}	6,43 \pm 0,29 ^{CD}	6,62 \pm 0,30 ^{EF}	7,25 \pm 0,26 ^{CD}	6,53 \pm 0,29 ^{FGH}	3,64 \pm 0,20 ^{GH}	NC
	<i>Bacillus subtilis</i>	1,77 \pm 0,00 ^{HUK}	5,65 \pm 0,05 ^{DE}	3,31 \pm 0,31 ^{JKLM}	6,33 \pm 0,13 ^{DE}	8,74 \pm 0,14 ^{EFG}	4,89 \pm 0,04 ^{EF}	5,48 \pm 0,37 ^{DE}
	<i>Bacillus megaterium</i>	0,41 \pm 0,03 ^{NO}	4,63 \pm 0,17 ^{FG}	1,72 \pm 0,06 ^{OP}	6,24 \pm 0,05 ^{DE}	10,30 \pm 1,29 ^{DEF}	NC	2,75 \pm 0,19 ^{DE}
	<i>Staphylococcus aureus</i>	2,24 \pm 0,22 ^{FGH}	5,78 \pm 0,07 ^{DE}	4,89 \pm 0,04 ^I	5,59 \pm 0,37 ^{EF}	14,56 \pm 2,09 ^{BC}	5,50 \pm 0,24 ^{CDE}	10,42 \pm 0,20 ^{CDE}
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2,41 \pm 0,13 ^{EFG}	6,77 \pm 0,20 ^{BC}	7,36 \pm 0,00 ^{DE}	7,38 \pm 0,03 ^{CD}	12,38 \pm 0,56 ^{CDE}	6,19 \pm 0,52 ^C	10,48 \pm 0,11 ^{CDE}
	<i>Lactococcus casei</i>	2,00 \pm 0,15 ^{GHIJ}	4,47 \pm 0,15 ^{FG}	6,23 \pm 0,24 ^{FGH}	1,39 \pm 0,22 ^K	5,29 \pm 0,02 ^{GHIJ}	5,49 \pm 0,27 ^{CDE}	4,69 \pm 0,00 ^{DE}
	<i>Lactococcus lactis</i>	2,23 \pm 0,20 ^{FGH}	3,78 \pm 0,24 ^{GH}	5,36 \pm 0,06 ^{HI}	1,84 \pm 0,18 ^{JK}	5,21 \pm 0,65 ^{GHIJ}	13,42 \pm 0,95 ^A	4,28 \pm 0,00 ^{DE}
	<i>Listeria monocytogenes</i>	2,28 \pm 0,22 ^{EFGH}	5,37 \pm 0,12 ^{EF}	5,08 \pm 0,97 ^I	7,78 \pm 0,04 ^C	15,86 \pm 1,50 ^{BC}	4,21 \pm 0,13 ^{FG}	11,44 \pm 0,14 ^{BCDE}
Bactérias Gram Negativas	<i>Enterobacter cloacae</i>	1,43 \pm 0,19 ^{JKL}	2,57 \pm 0,07 ^{IKL}	3,06 \pm 0,24 ^{JKLMN}	2,69 \pm 0,14 ^{IJ}	5,61 \pm 0,02 ^{GHI}	2,50 \pm 0,22 ^{JK}	NC
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	1,58 \pm 0,19 ^{JK}	2,88 \pm 0,34 ^{HUK}	9,26 \pm 0,00 ^C	4,84 \pm 0,86 ^{FG}	17,79 \pm 1,62 ^B	2,16 \pm 0,02 ^{JKL}	19,15 \pm 0,54 ^{BC}
	<i>Shigella</i> sp.	2,23 \pm 0,01 ^{FGH}	3,48 \pm 0,46 ^{HI}	3,62 \pm 0,29 ^{JK}	2,82 \pm 0,05 ^{IJ}	5,86 \pm 0,06 ^{GHI}	1,56 \pm 0,10 ^{LMN}	13,70 \pm 0,72 ^{BCDE}
	<i>Pseudomonas</i> sp.	11,19 \pm 0,62 ^A	10,39 \pm 0,18 ^A	10,81 \pm 0,58 ^B	10,48 \pm 0,16 ^B	NC	5,89 \pm 0,09 ^{CD}	9,84 \pm 0,24 ^{CDE}
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2,85 \pm 0,122 ^E	2,37 \pm 0,92 ^{KLM}	8,61 \pm 0,31 ^C	4,46 \pm 0,19 ^{FGH}	17,89 \pm 5,88 ^B	1,57 \pm 0,02 ^{LMN}	NC
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NM	4,47 \pm 0,33 ^{CD}	6,48 \pm 0,19 ^{BCD}	7,52 \pm 0,01 ^D	33,26 \pm 0,34 ^A	NC	11,21 \pm 0,69 ^B	NC
	<i>Pseudomonas aureuginosa</i> M	8,34 \pm 0,34 ^B	6,83 \pm 0,11 ^{BC}	6,36 \pm 0,08 ^{FG}	8,10 \pm 0,29 ^C	30,89 \pm 0,30 ^A	5,24 \pm 0,07 ^{DE}	23,96 \pm 5,60 ^B
	<i>Acinetobacter</i>	0,90 \pm 0,03 ^{LMN}	2,70 \pm 0,19 ^{IK}	1,26 \pm 0,20 ^Q	0,81 \pm 0,13 ^{KL}	1,13 \pm 0,01 ^K	0,46 \pm 0,14 ^{OP}	7,84 \pm 1,08 ^{CDE}
	<i>Serratia</i> sp.	4,72 \pm 0,13 ^{CD}	3,16 \pm 0,13 ^{HUK}	5,63 \pm 0,13 ^{GHI}	7,25 \pm 0,22 ^{CD}	13,09 \pm 0,17 ^{CD}	1,44 \pm 0,07 ^{LMN}	15,30 \pm 0,90 ^{BCD}
	<i>Klebsiella</i> sp.	2,77 \pm 0,05 ^{EF}	2,87 \pm 0,08 ^{HUK}	7,50 \pm 0,27 ^D	5,49 \pm 0,11 ^{EF}	4,68 \pm 0,19 ^{HUK}	2,79 \pm 0,02 ^{HUJ}	NC
	<i>Proteus mirabilis</i>	5,04 \pm 0,08 ^C	3,19 \pm 0,07 ^{HUK}	8,69 \pm 0,20 ^C	10,55 \pm 1,67 ^B	6,15 \pm 0,06 ^{GHI}	1,33 \pm 0,21 ^{LMN}	40,17 \pm 15,79 ^A
	<i>Escherichia coli</i> 8739	4,12 \pm 0,05 ^D	3,01 \pm 0,07 ^{HUK}	6,89 \pm 0,18 ^{DEF}	6,38 \pm 0,12 ^{DE}	6,45 \pm 0,35 ^{FGH}	3,44 \pm 0,16 ^{GHI}	15,91 \pm 8,85 ^{BCD}
	<i>Salmonella</i> sp.	1,62 \pm 0,00 ^{IK}	2,88 \pm 0,06 ^{HUK}	7,51 \pm 0,13 ^D	5,46 \pm 0,18 ^{EF}	6,11 \pm 0,00 ^{GHI}	2,77 \pm 0,16 ^{HUJ}	43,24 \pm 13,92 ^A
	<i>Salmonella typhimurium</i>	1,31 \pm 0,11 ^{KLM}	2,78 \pm 0,12 ^{IK}	7,60 \pm 0,10 ^D	9,72 \pm 0,41 ^B	15,76 \pm 1,37 ^{BC}	11,25 \pm 0,05 ^B	NC
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	2,19 \pm 0,14 ^{FGHI}	3,39 \pm 0,06 ^{HUJ}	2,72 \pm 0,13 ^{LMN}	3,72 \pm 0,16 ^{GHI}	7,76 \pm 0,07 ^{FGH}	1,76 \pm 0,25 ^{KLM}	NC
	<i>Aeromonas sobria</i>	0,74 \pm 0,00 ^{MN}	1,59 \pm 0,13 ^M	1,66 \pm 0,14 ^{OP}	0,85 \pm 0,00 ^{KL}	6,51 \pm 0,31 ^{FGH}	1,34 \pm 0,02 ^{LMN}	13,55 \pm 0,04 ^{BCDE}
	<i>Aeromonas ichthiosmia</i>	0,51 \pm 0,14 ^{NO}	2,72 \pm 0,02 ^{IK}	3,86 \pm 0,33 ^J	6,30 \pm 0,28 ^{DE}	1,41 \pm 0,32 ^{JK}	0,99 \pm 0,12 ^{MNO}	14,90 \pm 1,90 ^{BCD}
	<i>Aeromonas media</i>	0,93 \pm 0,00 ^{LMN}	1,62 \pm 0,15 ^{LM}	3,59 \pm 0,04 ^{JKL}	3,42 \pm 0,16 ^{HI}	4,38 \pm 0,20 ^{HUK}	0,80 \pm 0,13 ^{NOP}	7,03 \pm 0,22 ^{CDE}
Leveduras	<i>Candida albicans</i>	0,53 \pm 0,06 ^{NO}	2,76 \pm 0,06 ^{IK}	2,64 \pm 0,34 ^{MN}	3,49 \pm 0,08 ^{HI}	7,56 \pm 0,17 ^{FGH}	3,5 \pm 0,10 ^{GHI}	0,56 \pm 0,19 ^E
	<i>Candida pseudotropicalis</i>	0,04 \pm 0,02 ^O	0,00 \pm 0,00 ^N	0,08 \pm 0,00 ^R	0,09 \pm 0,00 ^L	1,08 \pm 0,00 ^k	0,02 \pm 0,02 ^P	0,44 \pm 0,04 ^E
	<i>Candida utilis</i>	0,96 \pm 0,09 ^{LMN}	1,67 \pm 0,21 ^{LM}	2,20 \pm 0,14 ^{NO}	1,43 \pm 0,13 ^K	6,43 \pm 0,03 ^{FGH}	2,53 \pm 0,23 ^{JK}	19,26 \pm 0,10 ^{BC}
	<i>Candida sake</i>	1,68 \pm 0,04 ^{HUK}	4,50 \pm 0,22 ^{FG}	2,82 \pm 0,23 ^{JKLMN}	2,68 \pm 0,08 ^{IJ}	8,74 \pm 0,14 ^{EFG}	2,99 \pm 0,15 ^{HID}	NC
	<i>Candida guilliermondii</i>	1,48 \pm 0,16 ^{JKL}	2,65 \pm 0,98 ^{IK}	2,59 \pm 0,14 ^{MN}	1,71 \pm 0,25 ^{JK}	4,42 \pm 0,19 ^{HUK}	1,82 \pm 0,10 ^{KLM}	10,74 \pm 0,46 ^{BCDE}
	<i>Pichia guilliermondii</i>	1,50 \pm 0,33 ^{JKL}	7,40 \pm 0,04 ^B	27,34 \pm 0,00 ^A	5,21 \pm 0,09 ^{EF}	2,21 \pm 0,09 ^{IK}	6,27 \pm 20,26 ^C	3,88 \pm 0,36 ^{DE}
	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	0,43 \pm 0,06 ^{NO}	2,48 \pm 0,30 ^{JKLM}	0,65 \pm 0,00 ^{QR}	1,34 \pm 0,25 ^K	5,88 \pm 0,10 ^{GHI}	2,71 \pm 0,27 ^{IJ}	9,16 \pm 0,23 ^{CDE}

* Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$)

NC- não calculado devido à ausência de decaimento dentro das concentrações experimentais utilizadas.

Tabela 3. Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos terpenoides (médias \pm desvio padrão) ($\mu\text{L/mL}$).

Microrganismos	Citral	Geraniol	Citronelal	Citronelol	1,8-Cineol	α -terpineol	β -cariofileno	
Bactérias Gram Positivas	<i>Bacillus cereus</i>	1,28 \pm 0,26 ^{NO PQ}	9,71 \pm 0,25 ^{BC}	8,16 \pm 0,01 ^{FGHIJ}	8,60 \pm 0,22 ^{DEFG}	8,05 \pm 0,47 ^{IJK}	4,41 \pm 0,35 ^{GHIJK}	NC
	<i>Bacillus subtilis</i>	3,57 \pm 0,00 ^{GHIJ}	9,19 \pm 0,32 ^C	4,56 \pm 0,06 ^{KLMN}	8,47 \pm 0,13 ^{DEFG}	10,37 \pm 0,35 ^{EFGHI}	5,77 \pm 0,05 ^{FGH}	9,13 \pm 0,03 ^{CDE}
	<i>Bacillus megaterium</i>	0,68 \pm 0,04 ^{PQ}	8,49 \pm 0,30 ^{CD}	2,22 \pm 0,03 ^{NO}	8,38 \pm 0,22 ^{DEFG}	13,20 \pm 1,17 ^{EFGH}	NC	4,29 \pm 0,22 ^{DE}
	<i>Staphylococcus aureus</i>	4,92 \pm 0,22 ^F	9,66 \pm 0,16 ^{BC}	9,18 \pm 0,01 ^{DEFGI}	9,31 \pm 0,10 ^{DEF}	29,06 \pm 0,63 ^{CD}	9,73 \pm 0,10 ^{DE}	20,19 \pm 0,03 ^{BCDE}
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	4,36 \pm 0,29 ^{FG}	9,46 \pm 0,33 ^C	8,45 \pm 0,00 ^{EFGHI}	8,49 \pm 0,06 ^{DEFG}	14,86 \pm 0,75 ^E	7,80 \pm 0,30 ^{EF}	12,37 \pm 0,15 ^{CDE}
	<i>Lactococcus casei</i>	3,38 \pm 0,25 ^{GHIJK}	10,66 \pm 0,41 ^{BC}	11,16 \pm 0,91 ^{CD}	3,28 \pm 0,26 ^{HI}	14,48 \pm 1,04 ^{EF}	10,70 \pm 0,04 ^{DE}	14,71 \pm 0,00 ^{CDE}
	<i>Lactococcus lactis</i>	3,79 \pm 0,26 ^{FGHI}	9,72 \pm 0,17 ^{BC}	13,31 \pm 0,14 ^{BC}	4,15 \pm 0,01 ^{GHI}	13,88 \pm 0,71 ^{EFG}	44,50 \pm 0,41 ^A	12,54 \pm 0,00 ^{CDE}
	<i>Listeria monocytogenes</i>	6,76 \pm 0,02 ^E	12,22 \pm 0,35 ^{AB}	9,63 \pm 2,23 ^{DEFG}	11,71 \pm 0,07 ^{CD}	25,29 \pm 1,27 ^D	6,72 \pm 0,14 ^{FG}	23,21 \pm 0,10 ^{BCDE}
Bactérias Gram Negativas	<i>Enterobacter cloacae</i>	2,11 \pm 0,04 ^{LMNO}	4,46 \pm 0,08 ^{FGH}	6,40 \pm 1,16 ^{IJK}	4,78 \pm 0,17 ^{EFGHI}	9,83 \pm 0,44 ^{FGHI}	4,48 \pm 0,27 ^{GHIJK}	NC
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	2,29 \pm 0,08 ^{KLMNO}	4,35 \pm 0,85 ^{FGH}	14,47 \pm 0,25 ^B	7,72 \pm 0,75 ^{DEFGH}	26,91 \pm 3,16 ^{CD}	3,76 \pm 0,05 ^{HJKLM}	28,92 \pm 0,58 ^{BC}
	<i>Shigella</i> sp.	4,03 \pm 0,06 ^H	6,16 \pm 0,21 ^{DEF}	7,22 \pm 0,17 ^{GHI}	7,86 \pm 0,07 ^{DEFGH}	8,80 \pm 0,46 ^{HIJ}	3,07 \pm 0,04 ^{IKLJMN}	23,26 \pm 0,81 ^{BCDE}
	<i>Pseudomonas</i> sp.	13,32 \pm 1,39 ^A	12,27 \pm 0,23 ^{AB}	13,00 \pm 0,61 ^{BC}	12,36 \pm 0,21 ^{CD}	NC	10,21 \pm 0,11 ^{DE}	16,18 \pm 0,76 ^{CDE}
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	4,28 \pm 0,27 ^{FGH}	3,84 \pm 1,24 ^{FGH}	10,60 \pm 0,11 ^{DE}	8,51 \pm 0,29 ^{DEFG}	34,51 \pm 3,21 ^B	2,24 \pm 0,16 ^{KLMN}	NC
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NM	10,59 \pm 1,06 ^B	13,43 \pm 3,39 ^A	14,17 \pm 1,29 ^B	49,27 \pm 8,62 ^A	NC	18,61 \pm 0,74 ^C	NC
	<i>Pseudomonas aureuginosa</i> M	13,77 \pm 0,12 ^A	14,48 \pm 2,41 ^A	11,44 \pm 0,08 ^{CD}	12,46 \pm 0,68 ^{CD}	53,55 \pm 3,30 ^A	10,24 \pm 0,19 ^D	39,58 \pm 10,10 ^B
	<i>Acinetobacter</i>	1,74 \pm 0,03 ^{MNOP}	5,72 \pm 0,36 ^{EFG}	2,38 \pm 0,13 ^{MNO}	1,47 \pm 0,40 ^I	2,58 \pm 0,56 ^L	0,94 \pm 0,19 ^N	16,93 \pm 2,90 ^{BCDEF}
	<i>Serratia</i> sp.	8,31 \pm 0,18 ^{CD}	4,78 \pm 0,03 ^{FGH}	10,11 \pm 0,58 ^{DEF}	11,29 \pm 0,08 ^{CD}	28,49 \pm 1,18 ^{CD}	2,26 \pm 0,01 ^{KLMN}	22,37 \pm 0,78 ^{BCDE}
	<i>Klebsiella</i> sp.	4,34 \pm 0,04 ^{FG}	4,71 \pm 0,06 ^{FGH}	15,28 \pm 1,36 ^B	9,73 \pm 0,10 ^{DE}	7,56 \pm 0,19 ^{IJK}	4,34 \pm 0,07 ^{GHIJK}	NC
	<i>Proteus mirabilis</i>	8,68 \pm 0,13 ^C	4,83 \pm 0,20 ^{FGH}	14,15 \pm 0,20 ^B	15,45 \pm 1,48 ^{BC}	10,06 \pm 0,26 ^{EFGHI}	1,89 \pm 0,40 ^{LMN}	70,24 \pm 27,27 ^A
	<i>Escherichia coli</i> 8739	7,29 \pm 0,27 ^E	4,46 \pm 0,12 ^{FGH}	10,04 \pm 0,64 ^{DEF}	8,87 \pm 0,10 ^{DEFG}	9,49 \pm 0,09 ^{GHI}	5,20 \pm 0,32 ^{GHI}	23,72 \pm 15,34 ^{BCDE}
	<i>Salmonella</i> sp.	3,30 \pm 0,18 ^{GHIJKL}	4,65 \pm 0,07 ^{FGH}	13,29 \pm 0,09 ^{BC}	9,24 \pm 0,17 ^{DEF}	9,43 \pm 0,22 ^{GHI}	4,43 \pm 0,15 ^{GHIJK}	70,84 \pm 23,50 ^A
	<i>Salmonella typhimurium</i>	3,14 \pm 0,31 ^{HJKLM}	4,95 \pm 0,21 ^{FGH}	22,71 \pm 2,15 ^A	18,52 \pm 0,53 ^B	31,31 \pm 5,87 ^{BC}	22,47 \pm 4,03 ^B	NC
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	3,45 \pm 0,44 ^{GHIJK}	4,41 \pm 0,26 ^{FGH}	4,11 \pm 0,01 ^{KLMN}	4,68 \pm 0,31 ^{FGHI}	8,89 \pm 0,04 ^{HIJ}	2,60 \pm 0,35 ^{JKLMN}	NC
	<i>Aeromonas sobria</i>	1,19 \pm 0,01 ^{OPQ}	2,50 \pm 0,13 ^{HI}	2,62 \pm 0,01 ^{LMNP}	1,20 \pm 0,04 ^I	10,53 \pm 0,09 ^{EFGHI}	2,25 \pm 0,03 ^{KLMN}	25,63 \pm 1,57 ^{BCD}
	<i>Aeromonas ichthiosmia</i>	0,86 \pm 0,20 ^{PQ}	4,43 \pm 0,20 ^{FGH}	7,34 \pm 0,28 ^{GHIJ}	10,11 \pm 0,02 ^D	1,93 \pm 0,02 ^L	1,54 \pm 0,33 ^{LMN}	26,79 \pm 3,83 ^{BCD}
<i>Aeromonas media</i>	1,33 \pm 0,05 ^{NOPQ}	2,74 \pm 0,10 ^{HI}	5,90 \pm 0,04 ^{JL}	4,52 \pm 0,03 ^{FGHI}	8,68 \pm 0,10 ^{HIJ}	1,49 \pm 0,45 ^{LMN}	12,51 \pm 0,39 ^{CDE}	
Leveduras	<i>Candida albicans</i>	0,80 \pm 0,04 ^{PQ}	4,34 \pm 0,32 ^{FGH}	4,78 \pm 0,23 ^{JL}	4,78 \pm 0,19 ^{EFGHI}	8,57 \pm 0,26 ^{HIJK}	4,92 \pm 0,19 ^{GHIJ}	4,86 \pm 0,86 ^{DE}
	<i>Candida pseudotropicalis</i>	0,42 \pm 0,09 ^Q	0,60 \pm 0,05 ^I	0,30 \pm 0,00 ^O	0,33 \pm 0,01 ^I	4,10 \pm 0,08 ^{JKL}	1,17 \pm 0,09 ^{MN}	2,36 \pm 0,30 ^F
	<i>Candida utilis</i>	1,59 \pm 0,30 ^{MNOPQ}	2,59 \pm 0,41 ^{HI}	3,43 \pm 0,31 ^{LMN}	3,13 \pm 0,12 ^{HI}	10,34 \pm 0,011 ^{EFGHI}	4,33 \pm 0,18 ^{GHIJK}	29,52 \pm 1,54 ^{BC}
	<i>Candida sake</i>	2,47 \pm 0,28 ^{JKLMN}	8,14 \pm 0,55 ^{CDE}	4,67 \pm 0,45 ^{KLM}	4,56 \pm 0,59 ^{FGHI}	10,37 \pm 0,35 ^{EFGHI}	4,82 \pm 0,10 ^{GHIJ}	NC
	<i>Candida guilliermondii</i>	2,78 \pm 0,45 ^{IJKLM}	3,18 \pm 1,01 ^{GHI}	4,72 \pm 0,25 ^{KLM}	4,45 \pm 0,33 ^{FGHI}	7,73 \pm 0,03 ^{IJK}	3,56 \pm 0,32 ^{HIJKLM}	14,74 \pm 1,42 ^{CDE}
	<i>Pichia guilliermondii</i>	2,30 \pm 0,35 ^{KLMNO}	8,56 \pm 0,12 ^{CD}	4,51 \pm 0,77 ^{KLM}	7,60 \pm 0,18 ^{DEFGH}	3,68 \pm 0,10 ^{KL}	9,47 \pm 0,17 ^{DE}	4,61 \pm 0,39 ^{DE}
	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	0,66 \pm 0,02 ^{PQ}	3,36 \pm 1,11 ^{GH}	0,93 \pm 0,01 ^O	2,44 \pm 0,34 ^I	10,46 \pm 1,04 ^{EFGHI}	4,46 \pm 0,02 ^{GHIJK}	15,49 \pm 0,67 ^{CDE}

* Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$)

NC- não calculado devido à ausência de decaimento dentro das concentrações experimentais utilizadas.

Em presença de geraniol, as bactérias Gram-positivas apresentaram CIM média de $9,89 \pm 1,12 \mu\text{L/mL}$, sendo que *L. monocytogenes* (CIM de $12,22 \mu\text{L/mL}$) foi a bactéria Gram-positiva mais resistente ao geraniol. Por outro lado, o geraniol exibiu CIM média de $5,96 \pm 3,55 \mu\text{L/mL}$ sobre bactérias Gram-negativas. Algumas linhagens de *Pseudomonas* apresentaram CIM significativamente superiores às demais bactérias deste grupo, sendo elas *Pseudomonas* sp., *P. aeruginosa* NM e *P. aeruginosa* M ($12,27$, $13,43$ e $14,48 \mu\text{L/mL}$, respectivamente). Ainda dentre as Gram-negativas, *A. sobria* ($2,5 \mu\text{L/mL}$) e *A. media* ($2,74 \mu\text{L/mL}$) apresentaram sensibilidade particularmente elevada ao geraniol (Tabela 3).

Constatou-se que bactérias Gram-positivas tratadas com citronelal apresentaram CIM média de $8,34 \pm 3,52 \mu\text{L/mL}$, sendo que a bactéria mais sensível a este composto foi *B. megaterium*, cuja concentração inibitória mínima foi $2,22 \mu\text{L/mL}$. A bactéria láctica *L. lactis*, por sua vez, mostrou-se mais resistente dentre as Gram-positivas, apresentando uma CIM de $13,31 \mu\text{L/mL}$. No caso de bactérias Gram-negativas, o citronelal exibiu uma CIM média de $10,29 \pm 5,18 \mu\text{L/mL}$. Analisando o crescimento das bactérias Gram-negativas diante da presença de citronelal, foi possível verificar que quatro cepas exibiram comportamento significativamente diferente das demais, sendo elas: *Acinetobacter* sp. ($2,38 \mu\text{L/mL}$), *A. sobria* ($2,62 \mu\text{L/mL}$), *A. hydrophila* ($4,11 \mu\text{L/mL}$) e *S. typhimurium* ($22,71 \mu\text{L/mL}$).

Citronelol inibiu 90% o crescimento tanto de bactérias Gram-positivas quanto de Gram-negativas; porém, algumas delas apresentaram comportamentos particulares quando comparadas às demais. No grupo das bactérias Gram-positivas, cuja CIM média foi $7,80 \pm 2,76 \mu\text{L/mL}$, *L. monocytogenes* ($11,71 \mu\text{L/mL}$) mostrou maior tolerância ao citronelol. As duas únicas bactérias lácticas avaliadas exibiram alta sensibilidade a este composto (*Lb. casei*, $3,28 \mu\text{L/mL}$ e *L. lactis*, $4,15 \mu\text{L/mL}$). Bactérias Gram-negativas apresentaram CIM média de $11,00 \pm 10,54 \mu\text{L/mL}$, sendo que apenas uma espécie mostrou CIM significativamente superior às demais ($49,27 \mu\text{L/mL}$ para *P. aeruginosa*

NM). Não houve diferença significativa na ação de citronelol sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

O terpenoide 1,8-cineol foi efetivo contra praticamente todos os microrganismos envolvidos neste estudo, exceto duas das três linhagens de *P. aeruginosa* (101 e NM). Embora diferenças entre o comportamento médio de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas frente ao 1,8-cineol não sejam evidentes ($16,15 \pm 7,25 \mu\text{L/mL}$ e $16,41 \pm 14,27\mu\text{L/mL}$, respectivamente), algumas diferenças podem ser evidenciadas dentro de cada grupo bacteriano. Dentre as Gram-positivas, *S. aureus* ($29,06 \mu\text{L/mL}$) e *L. monocytogenes* ($25,29 \mu\text{L/mL}$) exibiram valores significativamente superiores à média, enquanto *B. cereus* mostrou CIM ($8,05 \mu\text{L/mL}$) inferior à média. Já no caso das Gram-negativas, *P. fluorescens* e *P. aeruginosa* M apresentaram valores superiores, e *Acinetobacter* sp. e *A. ichthiosmia* valores inferiores, à média do grupo.

A concentração inibitória mínima do 1,8-cineol sobre *S. aureus* ($29,06 \mu\text{L/mL}$) determinada neste estudo foi superior à encontrada por Carson *et al.* (2002), $5 \mu\text{L/mL}$, porém muito semelhante à estabelecida por Magiatis *et al.*, (2002), $9,50 \mu\text{L/mL}$.

A concentração média de α -terpineol capaz de reduzir 90% do crescimento das bactérias Gram-positivas foi $12,80 \pm 14,14 \mu\text{L/mL}$. Apenas uma espécie, *L. lactis* (CIM de $44,50 \mu\text{L/mL}$) exibiu comportamento significativamente diferente das demais Gram-positivas, sendo ela a mais resistente entre as bactérias deste grupo. *B. megaterium* apresentou tolerância a este terpenoide, uma vez que não mostrou decaimento de crescimento nas condições experimentais utilizadas. A concentração inibitória mínima de α -terpineol sobre *S. aureus* ($9,73 \pm 0,10 \mu\text{L/mL}$) foi superior à determinada por Carson *et al.* (2002), cujo valor foi de $2,5 \mu\text{L/mL}$. As bactérias Gram-negativas apresentaram CIM médio de $5,68 \pm 6,05 \mu\text{L/mL}$, porém duas se destacaram por sua resistência: *P. aeruginosa* NM e *S. typhimurium* (CIM de $18,61$ e $22,47 \mu\text{L/mL}$, respectivamente). No presente estudo *E. coli* apresentou CIM semelhante ao previamente determinado por Penna *et al.* (1999).

As diferenças entre os valores de CIM determinados pelos variados estudos podem ser atribuídas ao fato de que apesar de serem de mesma espécie, os microrganismos são de linhagens diferentes.

Não foi observada redução de crescimento da bactéria Gram positiva *B. cereus*, assim como das bactérias Gram-negativas *E. cloacae*, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* NM, *Klebsiella sp.*, *A. hydrophila* e *S. typhimurium*, e da levedura *C. sake* quando tratadas com o sesquiterpeno β -cariofileno, nas condições experimentais utilizadas. As bactérias Gram-positivas mostraram CIM média de $13,78 \pm 6,40 \mu\text{L/mL}$. Duas Gram-positivas mostraram diferenças significativas quando comparadas com as demais: enquanto *B. subtilis* (CIM de $9,13 \mu\text{L/mL}$) apresentou menos resistência ao sesquiterpeno e *L. monocytogenes* ($23,21 \mu\text{L/mL}$) mostrou maior tolerância a este composto.

Pauli (2001) afirma que sesquiterpenos alcoólicos e ácidos graxos não apresentam propriedades inibitórias pronunciadas contra bactérias Gram-negativas. Isto foi comprovado no presente trabalho, uma vez que bactérias Gram-negativas apresentaram CIM médio de $28,41 \pm 16,61 \mu\text{L/mL}$. *P. mirabilis* ($70,24 \mu\text{L/mL}$) e *Salmonella sp.* ($70,84 \mu\text{L/mL}$) exibiram CIM consideravelmente superior às demais, mostrando desta forma serem muito mais resistentes ao composto.

Numa comparação global do comportamento de bactérias Gram-negativas e bactérias Gram-positivas frente aos seis terpenoides e ao terpeno avaliados, foi evidenciada elevada variação quanto à resistência/susceptibilidade das bactérias dentro de cada grupo, conforme pode ser observado nas Tabelas 2 e 3 e nos desvios das Figuras 4 e 5, porém não foi constatada diferença evidente entre os comportamentos de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas frente aos compostos de um modo geral. Estas constatações indicam que a presença da membrana externa lipoprotéica de bactérias Gram-negativas, por si só, não estabelece uma barreira eficaz, permitindo a interação dos terpenoides e do terpeno com a membrana celular.

Outtara *et al.* (1997) e Mangena & Muyima (1999) avaliando o efeito de óleos essenciais sobre bactérias concluíram que bactérias Gram-positivas são mais sensíveis do que as Gram-negativas. Esta aparente discrepância está associada ao pequeno número de bactérias avaliadas por parte destes autores e a utilização de misturas de terpenos (óleos essenciais) que levam à redução das variações entre indivíduos.

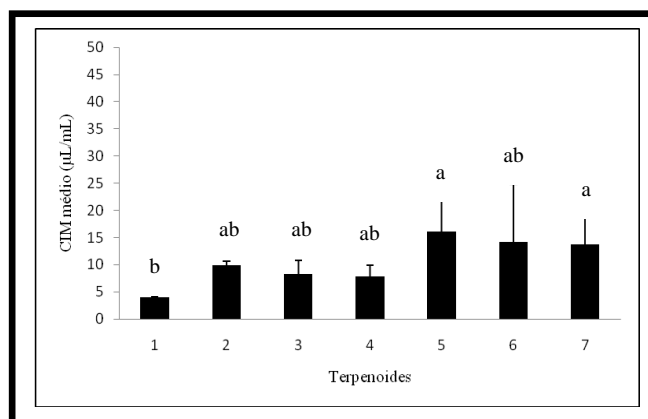


Figura 4. Concentração inibitória mínima de citral (1), geraniol (2), citronelal (3), citronelol (4), 1,8-cineol (5), α -terpineol (6) e β -cariofileno (7) de bactérias Gram-positivas. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

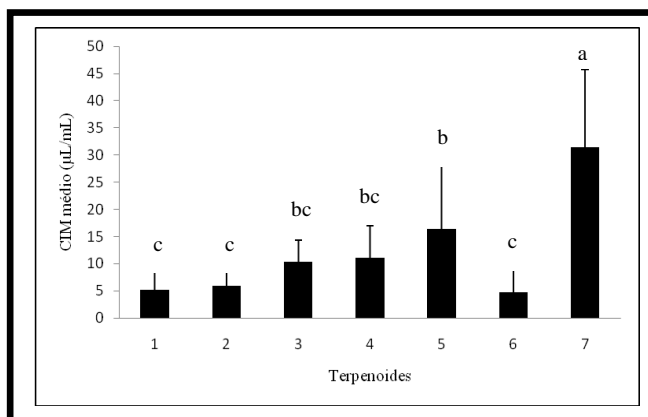


Figura 5. Concentração inibitória mínima de citral (1), geraniol (2), citronelal (3), citronelol (4), 1,8-cineol (5), α -terpineol (6) e β -cariofileno (7) de bactérias Gram-negativas. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

O elevado desvio padrão observado nas Figuras 4 e 5 se deve ao fato de, os microrganismos, apesar de pertencerem a um mesmo grupo, apresentam características

diferentes entre si, gerando assim valores de CIM variados. De acordo com Sikkema *et al.* (1993, 1995), a membrana celular pode ser significativamente diferente entre um organismo e outro, afetando a permeabilidade e, conseqüentemente, a resposta dos mesmos a compostos inibitórios. Por outro lado, não se pode descartar que diversos mecanismos, como bombas de efluxo, modificação de sítios alvo e modificação enzimática da molécula inibitória, bem conhecidos no caso de antibióticos, podem atuar de forma a tornar o microrganismo resistente a terpenos ou grupos de terpenoides. Cabe ressaltar que alguns dos microrganismos avaliados no presente trabalho como, por exemplo, representantes do gênero *Pseudomonas* são capazes de transformar ou utilizar terpenoides, no caso citral e citronelal, como fonte de carbono, nitrogênio, entre outros (Tozoni *et al.*, 2010).

Comparando-se o efeito dos terpenoides utilizados sobre o crescimento microbiano, foi possível constatar, de um modo geral, que o citral apresenta maior espectro de ação, sendo capaz de inibir o crescimento de 69,2% (18/26) das bactérias avaliadas quando em concentrações inferiores a 5 µL/mL (Tabela 3). Já o geraniol e o α-terpineol, em concentração inferior a 5 µL/mL, foram capazes de inibir o crescimento de apenas 50% das bactérias avaliadas, enquanto o citronelal e o citronelol, em concentração <5 µL/mL, inibiram apenas o crescimento de 15,4% e 26,9% das bactérias, respectivamente. Os terpenoides com menor espectro de ação antibacteriana foram o 1,8-cineol e o β-cariofileno.

Analisando-se a susceptibilidade bacteriana aos terpenoides de estrutura molecular semelhante (Figura 2), constatou-se que não há diferenças consistentes na comparação entre as respostas ao citronelal e citronelol (Tabela 3). Para o citral, com exceção de *Pseudomonas* e um grupo de enterobactérias, os valores de CIM foram muito inferiores àqueles apresentados pelo geraniol. Este resultado indica que o tipo de radical, por si só, não afeta de forma importante a atividade antibacteriana dos terpenos oxigenados. Por outro lado, a elevada atividade antimicrobiana do citral em comparação com o citronelal mostra que a presença de duplas ligações entre carbonos próximos ao

radical aldeído (Figura 2) pode aumentar a atividade antimicrobiana do terpenoide através do incremento da reatividade do oxigênio.

A comparação das respostas bacterianas aos terpenoides 1,8-cineol e α -terpineol mostra que o segundo apresenta, com raras exceções, maior atividade do que o primeiro, indicando que a disponibilidade do radical hidroxila é essencial para a atividade destes compostos. O 1,8-cineol é um terpenoide derivado do α -terpineol através da formação de um anel heterocíclico (Figura 2) que no qual o oxigênio encontra-se numa função éter (Dewick, 2009).

4.4. Concentração inibitória mínima (CIM) para leveduras

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 3, a concentração inibitória mínima média do citral sobre leveduras foi $1,57 \pm 0,96 \mu\text{L/mL}$. O menor valor de CIM foi obtido para A *C. pseudotropicalis* ($0,42 \mu\text{L/mL}$) e o maior para *Candida guilliermondi* ($2,78 \mu\text{L/mL}$). A CIM para o isolado de *C. albicans* ($0,8 \mu\text{L/mL}$) utilizado no presente trabalho foi maior que a determinada por Onawunmi (1989) para a linhagem NCPF 3179 foi 0,05% v/v.

Atividade antifúngica do citral foi evidenciada por Mesa-Arango *et al.* (2009) em óleos essenciais de um quimiotipo de *Lippia alba* com alta concentração de neral e geraniol. Segundo Harris (2002), o citral atua sobre a membrana celular do microrganismo afetando a sua estrutura, bloqueando a síntese da membrana; inibindo germinação dos esporos, proliferação dos fungos e respiração celular.

As leveduras estudadas expostas a geraniol mostraram uma CIM média de $4,40 \pm 2,93 \mu\text{L/mL}$. *C. pseudotropicalis* (CIM de $0,60 \mu\text{L/mL}$) exibiu menor resistência ao geraniol. Por outro lado, as leveduras que demonstraram maior resistência ao geraniol foram *C. sake* ($8,14 \mu\text{L/mL}$) e *P. guilliermondii* ($8,56 \mu\text{L/mL}$).

Citronelal mostrou ser eficiente contra leveduras, apresentando CIM média de $3,33 \pm 1,92 \mu\text{L/mL}$. Já o citronelol apresentou CIM média de $3,90 \pm 2,27 \mu\text{L/mL}$. *P. guillermondii*, com CIM de $7,60 \mu\text{L/mL}$, exibiu maior tolerância ao citronelol.

A média da CIM das leveduras, quando expostas ao terpenoide 1,8-cineol, foi de $7,90 \pm 2,92 \mu\text{L/mL}$. Tanto *C. pseudotropicalis* quanto *P. guillermondii* exibiram valores de CIM diferentes das demais leveduras, mostrando que são mais susceptíveis ao 1,8-cineol. *C. albicans* exibiu CIM de $8,57 \mu\text{L/mL}$. Este valor é superior ao valor encontrado por Magiatis *et al.* (2002), cujo CIM foi de $0,25 \mu\text{L/mL}$. Mondello *et al.* (2006), por sua vez, mostrou em seu estudo, que *C. albicans* de diferentes linhagens podem exibir CIM que variam 1% a >4% v/v. Em presença de α -terpienol, as leveduras apresentaram CIM médio de $4,67 \pm 2,47 \mu\text{L/mL}$, variação de $1,17 \mu\text{L/mL}$ (*C. pseudotropicalis*) a $9,47 \mu\text{L/mL}$ (*P. guillermondii*).

O CIM médio do único sesquiterpeno utilizado no presente estudo, β -cariofileno, sobre as leveduras foi de $11,93 \pm 10,25 \mu\text{L/mL}$. A única levedura que teve seu comportamento significativamente diferente das demais foi *C. utilis*, com $29,52 \mu\text{L/mL}$. *C. albicans* exibiu CIM de $4,86 \pm 0,86 \mu\text{L/mL}$. No entanto, este resultado não corrobora os dados de Liolios *et al.* (2007), que relatam que β -cariofileno não é ativo contra esta espécie de leveduras.

Na Figura 6, assim como na Tabela 2, é possível constatar elevada variação na resposta das leveduras a alguns terpenoides, particularmente o sesquiterpeno β -cariofileno. Conforme citado anteriormente, o mais eficiente dos terpenoides avaliados foi o citral, capaz de inibir o crescimento de todas as leveduras avaliadas em concentrações inferiores a $3 \mu\text{L/mL}$ (Tabela 3).

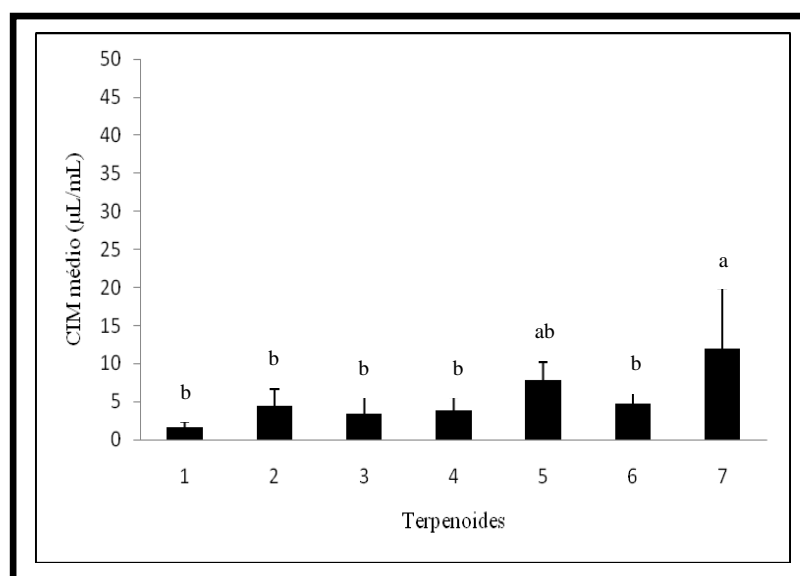


Figura 6. Concentração inibitória mínima de citral (1), geraniol (2), citronelal (3), citronelol (4), 1,8-cineol (5), α -terpineol (6) e β -cariofileno (7) diante de leveduras. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

Os resultados obtidos sobre leveduras confirmam parcialmente aqueles obtidos em bactérias. Em ambos grupos microbianos, o citral foi o terpenoide com maior atividade antimicrobiana e o β -cariofileno o menos eficiente. Da mesma forma, na comparação entre terpenoides de estrutura semelhante, constata-se maior atividade de citral em relação ao citronelal, possivelmente pela maior reatividade do radical aldeído próximo a uma dupla ligação, assim como do α -terpineol em relação ao 1,8-cineol, no qual o oxigênio encontra-se ciclado formando um radical éter.

4.5. Avaliação da viabilidade microbiana na presença de citral e geraniol

Após a determinação da concentração inibitória mínima sobre o crescimento microrganismos, foi avaliado o efeito dos terpenoides (nos valores de CIM correspondentes) sobre a viabilidade celular; ou seja, sua ação microcida sobre leveduras e algumas bactérias selecionadas. Para tanto, foram utilizados os terpenoides citral e geraniol com base nas suas estruturas químicas (monoterpenóides aldeído e álcool, respectivamente). Neste trabalho, não foram utilizados microrganismos que nos

testes de terpenoides apresentaram concentração inibitória superior a 10 μ L/mL e as bactérias esporuladas. Cabe comentar que o limite de contagem foi de 10² UFC/ml para este teste.

A Figura 7 mostra a atuação dos terpenoides citral e geraniol sobre a viabilidade das bactérias Gram-positivas *L. lactis*, *S. aureus* e *S. epidermidis* e de citral sobre *Lb. casei* e *L. monocytogenes*. Nas bactérias Gram-positivas constatou-se que, de uma maneira geral, o geraniol foi o terpenoide mais eficiente, já que nas primeiras horas de avaliação reduziu de forma evidente a viabilidade celular dos microrganismos.

As bactérias lácticas apresentaram redução de viabilidade celular da ordem de 7 log₁₀ quando tratadas com os terpenoides por 180 minutos. Tanto citral quanto geraniol mostraram potente ação microcida sobre *L. lactis*. O mesmo comportamento foi observado em *Lb. casei* em presença de citral.

Com relação à *L. monocytogenes*, o citral reduziu 4 log₁₀ em 30 minutos de teste e depois disso, a viabilidade celular foi mantida. No caso de *S. aureus* e *S. epidermidis*, citral e geraniol apresentaram menor ação microcida quando comparada com a atividade sobre as bactérias lácticas. O primeiro microrganismo apresentou uma redução de 4 log₁₀ quando tratado com geraniol enquanto o segundo apresentou uma queda de 5 log₁₀ com citral. A ação destes terpenoides pode ser vista já nos primeiros minutos, com o decaimento de um a dois logaritmos, seguido de uma manutenção da viabilidade celular, podendo esta resposta estar associada a duas situações: seleção de microrganismos resistentes ou tempo insuficiente de atuação do óleo sobre as células microbianas. Este efeito bactericida de citral está associado a modificações na membrana e com isto ao aumento na sua absorção pelo microrganismo (Onawunmi, 1989).

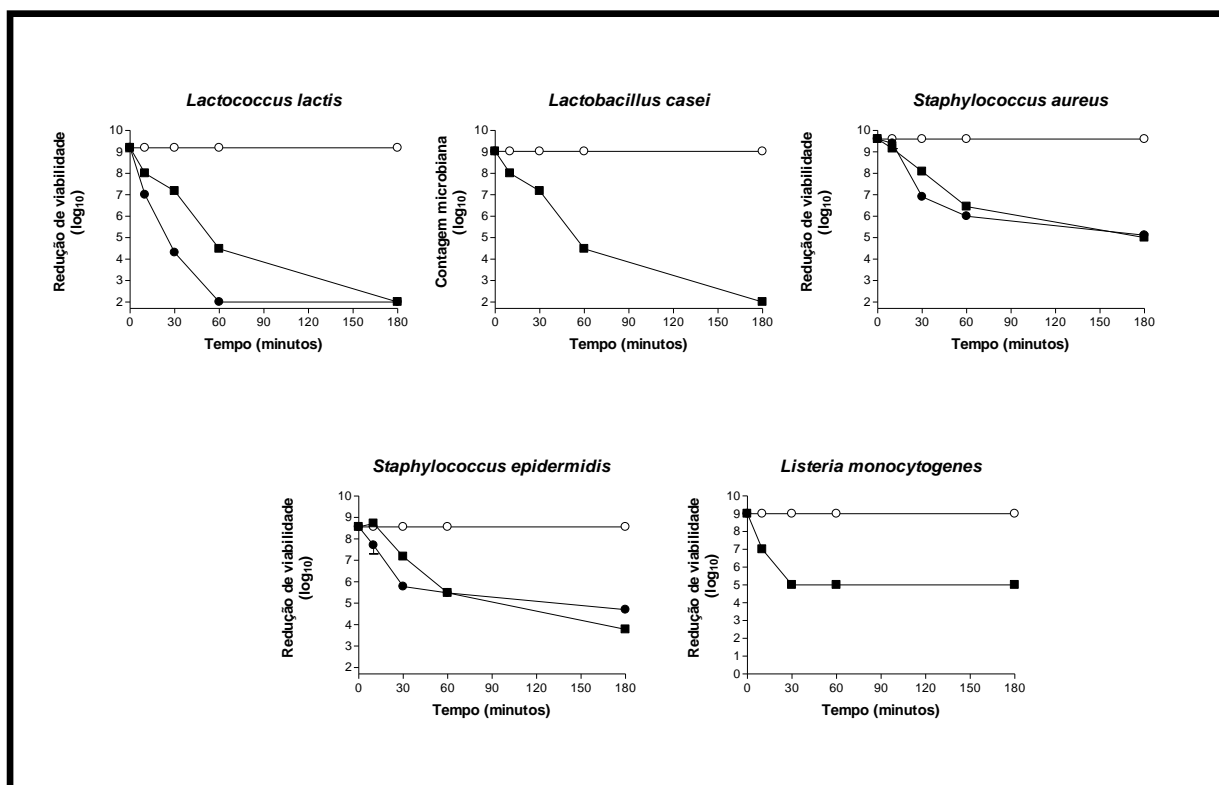


Figura 7. Inibição do crescimento das bactérias Gram-positivas *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Listeria monocytogenes* por citral (■) e geraniol (●). Controle sem adição de terpenóide (○)

As bactérias Gram-negativas também apresentaram redução de viabilidade celular quando na presença dos terpenóides citral e geraniol (Figuras 8 a 10). *E. coli*, *Klebsiella* sp. e *Salmonella* sp. exibiram redução de viabilidade média de, aproximadamente, 7 log₁₀. Já *Acinetobacter* sp., *Serratia* sp., *Proteus mirabilis*, *A. hydrophila*, *A. ichtiosmia*, *A. media* e *A. sobria* apresentaram redução de aproximadamente 6 log₁₀. As bactérias *S. typhimurium*, *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae* e *P. fluorescens* mostraram redução de 8 log₁₀. Para as bactérias *Klebsiella* sp., *Acinetobacter* sp., *S. typhimurium*, *E. aerogenes* e *P. fluorescens* houve uma redução drástica do número de UFC nos primeiros 30 minutos. As possíveis causas deste tipo de comportamento já foram vistas anteriormente, no caso *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *S. epidermidis*.

Serratia sp. tratada com geraniol teve sua viabilidade reduzida em 7 log₁₀, enquanto com citral a redução foi de 6 log₁₀. Já com *Shigella* sp., o geraniol mostrou maior eficiência, já que reduziu em torno de 8 log₁₀ em 30 minutos, enquanto que citral reduziu 7 log₁₀ no mesmo período de tempo.

Os resultados obtidos para *Salmonella* sp. indicam que citral é menos efetivo que geraniol, dado que o primeiro composto reduziu cerca de 6 log₁₀ e o segundo aproximadamente 7 log₁₀.

Em presença de citral, a viabilidade celular de *E. cloacae* apresentou uma redução de 8 log₁₀ em 30 minutos, já geraniol apresentou a mesma redução em 60 minutos. Sendo assim, os resultados indicam que para este microrganismo o citral é mais eficiente.

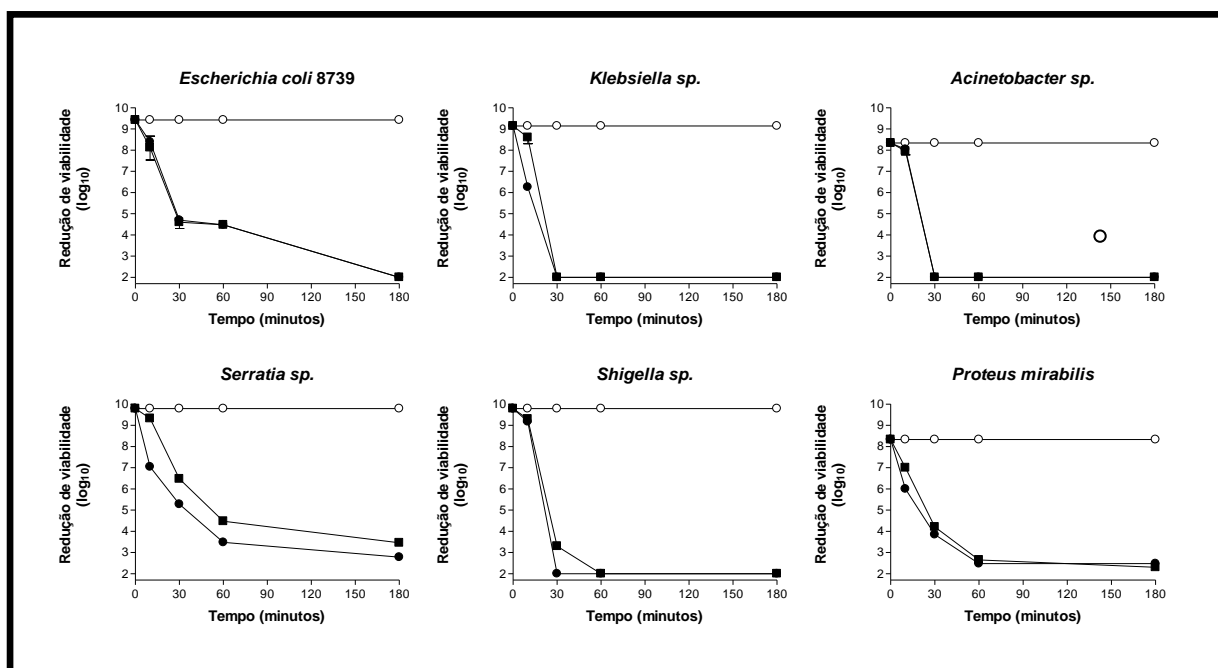


Figura 8. Inibição do crescimento de *Escherichia coli*, *Acinetobacter* sp., *Klebsiella* sp., *Serratia* sp., *Shigella* sp. e *Proteus mirabilis* por citral (■) e geraniol (●). Controle sem adição de terpenóide (○)

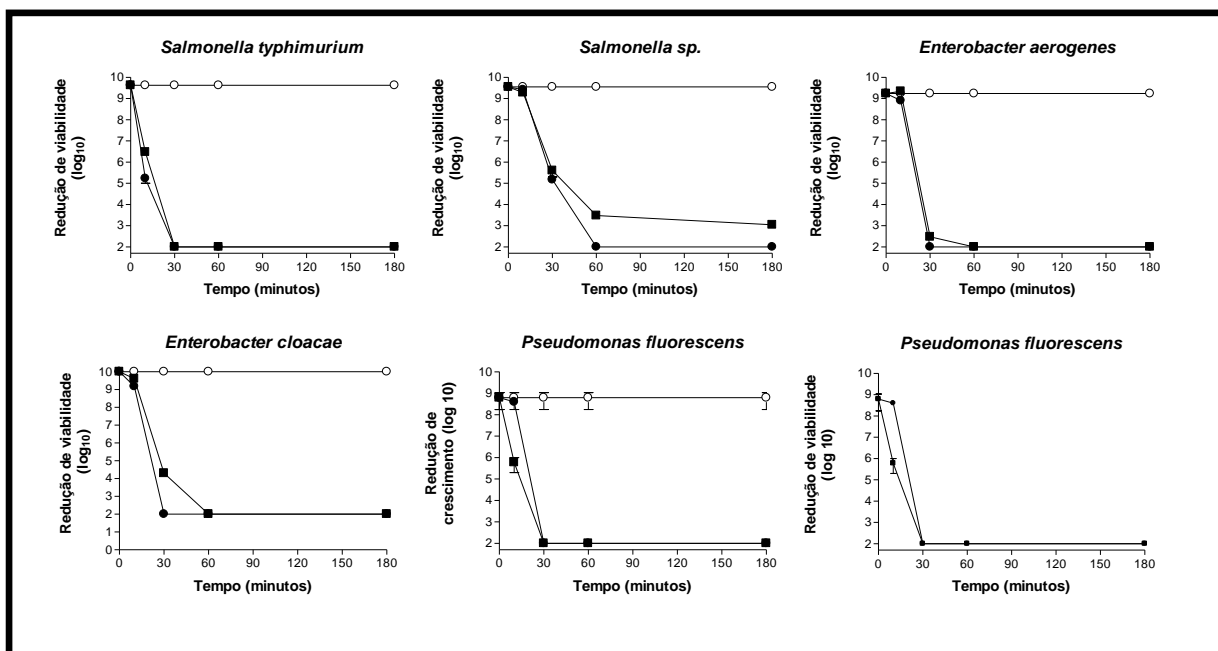


Figura 9. Inibição do crescimento de *Salmonella typhimurium*, *Salmonella sp.*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* e *Pseudomonas fluorescens* por citral (■) e geraniol (●). Controle sem adição de terpenóide (○)

Citral e geraniol agiram de forma microcida sobre todas as linhagens de *Aeromonas* testadas (Figura 10). Todas tiveram sua viabilidade reduzida a 10^2 UFC/mL em 30 minutos de avaliação. Para *A. ichtiosmia*, em presença de geraniol, o tempo necessário para redução da viabilidade na mesma proporção foi de apenas 10 minutos.

As diferenças entre a atuação de citral e geraniol sobre as bactérias podem ser atribuídas às interações entre estes compostos e as estruturas bacterianas (Sikkema *et al.* 1995). Segundo Onawunmi (1989), o efeito bactericida de citral observado sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas pode ser atribuído às mudanças na superfície bacteriana, o que aumenta a absorção do citral. Este autor avaliou a viabilidade celular de *E. coli* (NCTC10418) e *S. aureus* (NCTC3251). Concentrações de citral da ordem de 10 μ L/mL fizeram com que diminuísse rapidamente a contagem de células viáveis nos primeiros 30 minutos, e uma seguida retomada do crescimento celular. De acordo com este autor, possíveis explicações para este fenômeno podem ser

atribuídas a algum dano recuperado ou ao desenvolvimento de linhagens resistentes, que por sua vez podem ser menos afetadas pelo citral.

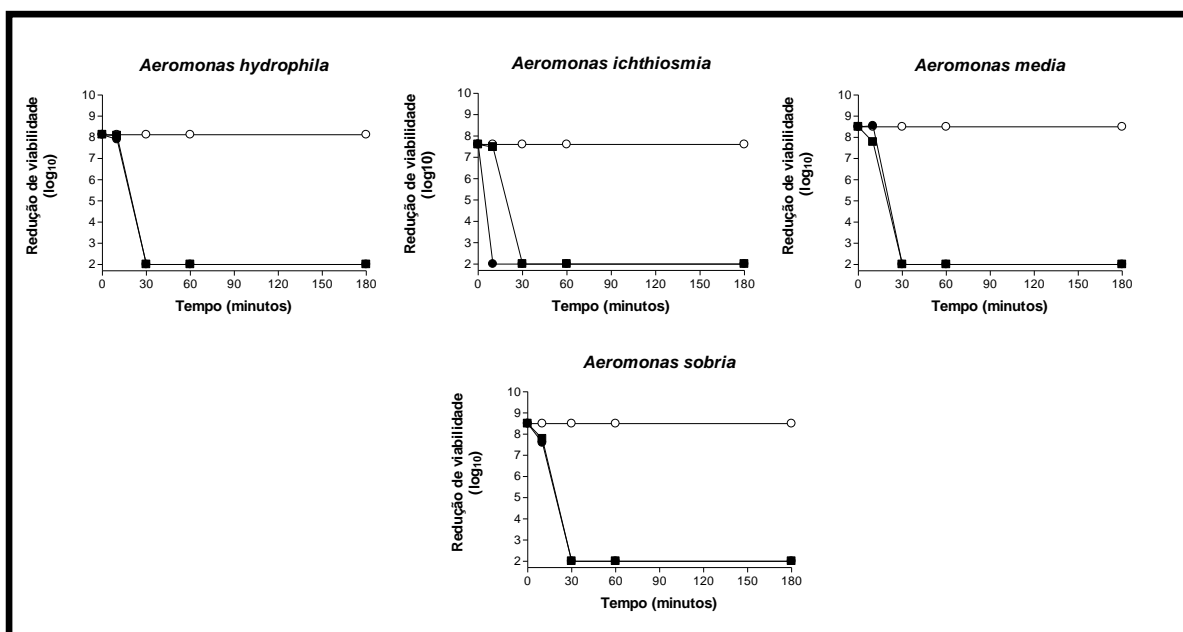


Figura 10. Inibição do crescimento de *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas ichthiosmia*, *Aeromonas media* e *Aeromonas sobria* por citral (■) e geraniol (●). Controle sem adição de terpenóide (o)

Citral diminuiu a viabilidade celular da grande maioria das leveduras testadas, exceto *S. cerevisiae* (Figura 11). De acordo com os resultados, este terpenoide foi capaz de reduzir em torno de 3 log₁₀ a viabilidade de *C. albicans*, 5 log₁₀ de *C. guillermondii*, 5 log₁₀ de *P. guillermondii*, 4 log₁₀ de *C. sake*, 4 log₁₀ de *C. pseudotropicalis* e 6 log₁₀ de *C. utilis*.

Os resultados obtidos para *C. albicans* na presença de citral, assemelham-se ao que Onawunmi (1989) encontrou para *C. albicans* (NCPF3179), no que diz respeito à queda da viabilidade celular nos 30 minutos iniciais. Porém, o autor observou um aumento de células viáveis nos tempos subsequentes. Este aumento não foi observado no presente trabalho, já que as células foram ressuspensas em solução salina 0,9%.

A susceptibilidade de *Candida* spp. a agentes antifúngicos não é uniforme e muitos mecanismos de resistência têm sido relatados como mudanças na parede celular

ou membrana plasmática, mutações, sequestro do antifúngico por parte de organelas como vacúolos, ou ainda mudanças cromossômicas (Eggimann *et al.* 2003), e estas observações podem explicar diferenças de eficácia de citral sobre estes microrganismos (Da Silva *et al.* 2008).

O geraniol, por sua vez, foi mais eficiente que o citral no que diz respeito à capacidade fungicida. Em todos os casos ele reduziu a viabilidade celular das leveduras em um intervalo de tempo menor que o citral. Os resultados mostram que este terpenoide foi capaz de reduzir aproximadamente 4 log₁₀ de viabilidade de *S. cereviasae*, 4 log₁₀ de *C. albicans*, 5 log₁₀ de *C. guilliermondii*, 5 log₁₀ de *P. guilliermondii*, 4 log₁₀ de *C. sake*, 4 log₁₀ de *C. pseudotropicalis* e 6 log₁₀ de *C. utilis*.

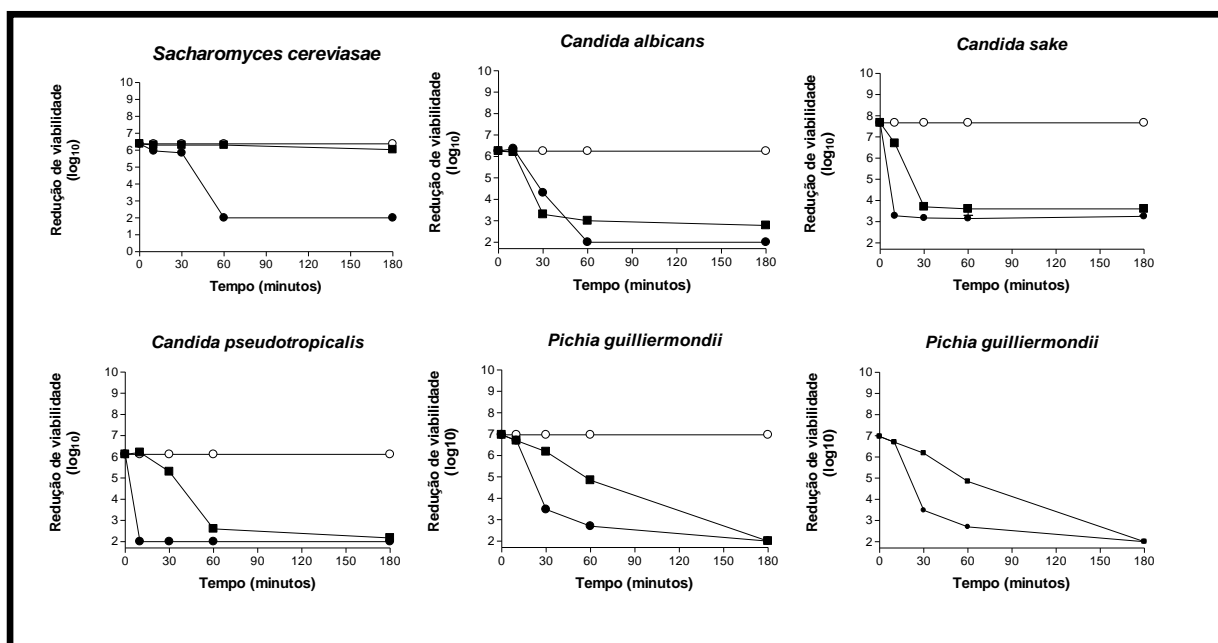


Figura 11. Inibição do crescimento de *Saccharomyces cereviasae*, *Candida albicans*, *Pichia guilliermondii*, *Candida sake*, *Candida guilliermondii* e *Candida utilis* por: citral (■) e geraniol (●). Controle sem adição de terpenóide (○)

Segundo Sikkema *et al.* (1993), hidrocarbonetos cíclicos se acumulam na membrana celular dos microrganismos alterando a permeabilidade celular. Como resultado ocorre uma modificação no potencial elétrico e gradiente de pH. Sendo assim, apesar de não serem hidrocarbonetos cíclicos, esta pode ser uma explicação para as

diferenças entre o comportamento de citral e geraniol sobre a viabilidade celular dos diferentes microrganismos. As interações entre os terpenoides e as membranas biológicas modificam sua estrutura e função, afetando assim, a atividade e crescimento das células.

4.6. Inibição de respiração microbiana por terpenoides

A avaliação da inibição da respiração microbiana foi determinada para as leveduras *S. cerevisiae* e *C. albicans*, quando na presença de citral, citronelal, citronelol e geraniol, e para as bactérias *S. typhimurium* e *S. aureus*, utilizando somente citral e citronelal. Em todos os casos, foram avaliadas concentrações correspondentes a 1, 0,5 e 0,1 CIM, além de controles sem terpenoides.

Neste teste, foi possível mostrar uma inibição significativa no consumo de oxigênio dos quatro organismos testados na presença de terpenoides (Figuras 12 a 15). Este fato pode estar associado a modificações na cadeia de transporte de elétrons na membrana citoplasmática no caso de bactérias e na membrana mitocondrial em leveduras. Esta redução na taxa respiratória também foi vista em *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans* na presença de 5µL/mL de óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (Cox *et al.* 2000).

Nos testes com terpenoides, *C. albicans* mostrou uma inibição significativa da taxa respiratória mesmo quando adicionado um décimo da concentração inibitória mínima de citral, citronelal, citronelol, com exceção do geraniol (Figura 12). Estes dados mostram que os terpenoides de maneira geral não atuam apenas na membrana citoplasmática, mas penetram na célula interferindo também na atividade mitocondrial (Cox *et al.* 2000; Bakkali, *et al.* 2008). Quando avaliada na concentração inibitória mínima, determinada previamente para os terpenoides, foi possível verificar que tanto citral como citronelal inibiram quase 100% da taxa respiratória desta levedura.

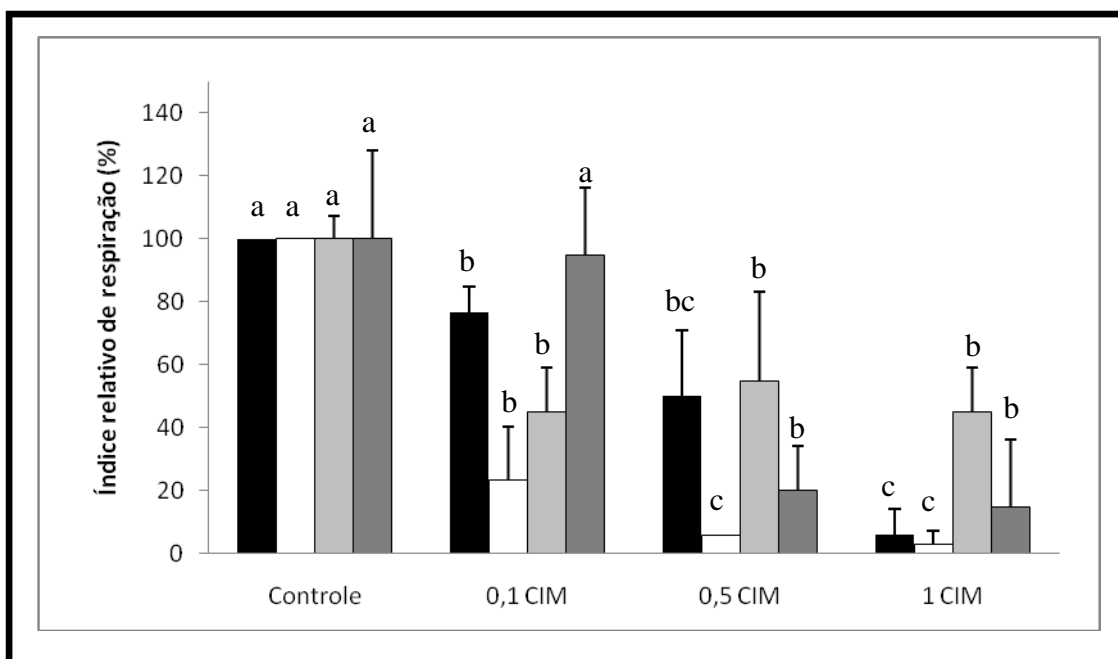


Figura 12. Índice relativo de respiração (%) de *Candida albicans*, na presença dos terpenoides citral ■ , citronelal □ , citronelol ▒ e geraniol ■ , nas concentrações correspondentes a controle (sem adição de tepenoides), 0,1, 0,5 e 1 CIM. Ao controle foi adicionado triton X-100 0,1%. Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

Através do índice relativo de respiração em *S. cerevisiae*, realizado na presença de concentração baixa de glicose, foi possível observar que somente a partir da metade da concentração inibitória mínima, a taxa respiratória passou a ser reduzida por citral, citronelal e citronelol (Figura 13). Com 0,1 CIM a respiração deste microrganismo já foi significativamente reduzida por geraniol. Esta levedura apresenta inibição de respiração quando adicionada da CIM de citral, citronelol e geraniol, mostando que o efeito dos terpenoides é muito dependente do microrganismo testado. Este fato pode estar associado às diferenças nas membramas citoplasmáticas e mitocôndriais dos diferentes gêneros de leveduras. Em células eucarióticas, já foi descrito que os óleos essenciais provocam despolarização da membrana com descréscimo no potencial de oxi-redução, afetando assim, o ciclo de cálcio ou outras bombas iônicas com redução do gradiente de

pH e da bomba de prótons e com isto a geração de ATP (Richter & Schlegel, 1993, Novgorodov & Gudz, 1996, Vercesi *et al.* 1997, Bakkali *et al.* 2008).

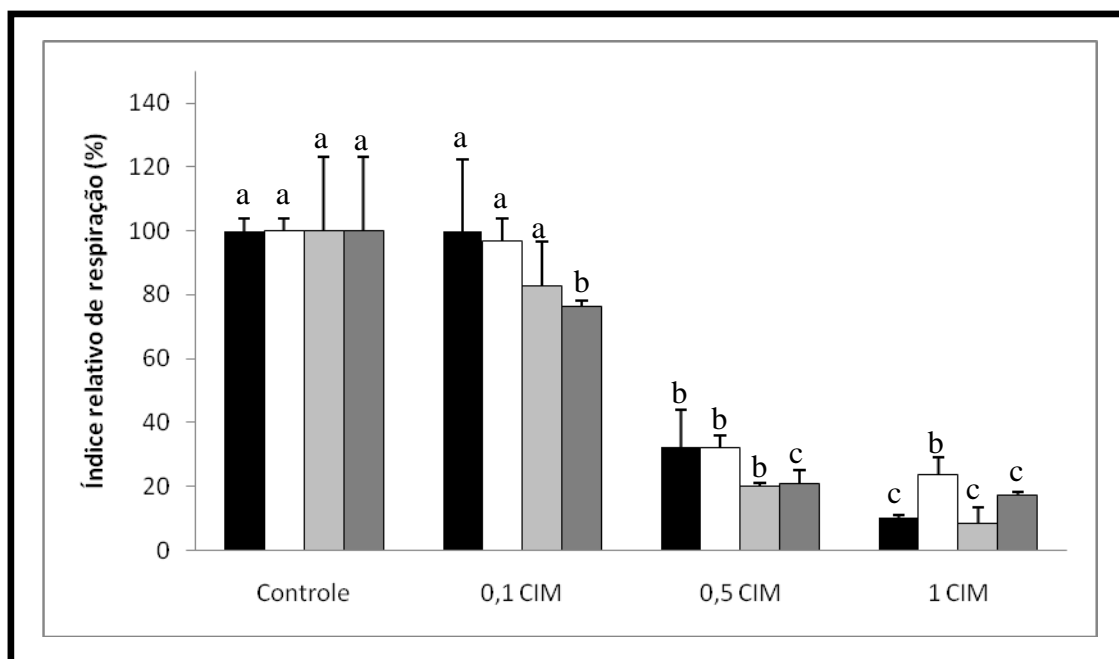


Figura 13. Índice relativo de respiração (%) de *Saccharomyces cerevisiae*, na presença dos terpenoides citral ■, citronelal □, citronelol ◻ e geraniol ◼, nas concentrações correspondentes a controle (sem adição de terpenoides), 0,1, 0,5 e 1 CIM. Ao controle foi adicionado triton X-100 0,1%. Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

Nos testes de taxa respiratória de bactérias, foi avaliada somente a ação dos terpenoides citral e citronelal. Em *S. typhimurium*, o citronelal inibiu a respiração mais que citral (Figura 14). Adição de somente um décimo da concentração inibitória mínima já inibiu totalmente a respiração desta bactéria. Já o citral na concentração inibitória mínima inibiu 80% da taxa respiratória. Este dado mostra que o efeito dos terpenos é dependente dos tipos de compostos e microrganismos (Cowan, 1999).

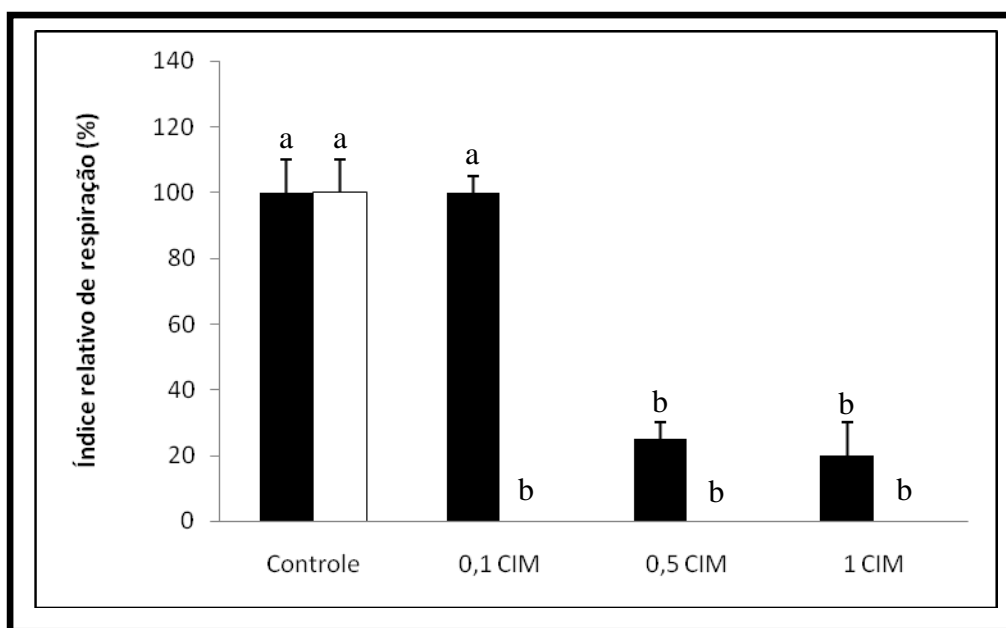


Figura 14. Índice relativo de respiração (%) de *Salmonella typhimurium* na presença dos terpenoides citral ■ e citronelal □, nas concentrações correspondentes a controle (sem adição de tepenoides), 0,1, 0,5 e 1 CIM. Ao controle foi adicionado triton X-100 0,1%. Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

Já para *S. aureus*, a adição tanto de citral como de citronelal na metade do valor de CIM inibiu quase que totalmente a taxa respiratória (Figura 15), mostrando que uma bactéria Gram positiva é mais sensível que uma Gram negativa, fato observado também com *Melaleuca alternifolia* (Cox *et al.* 2000).

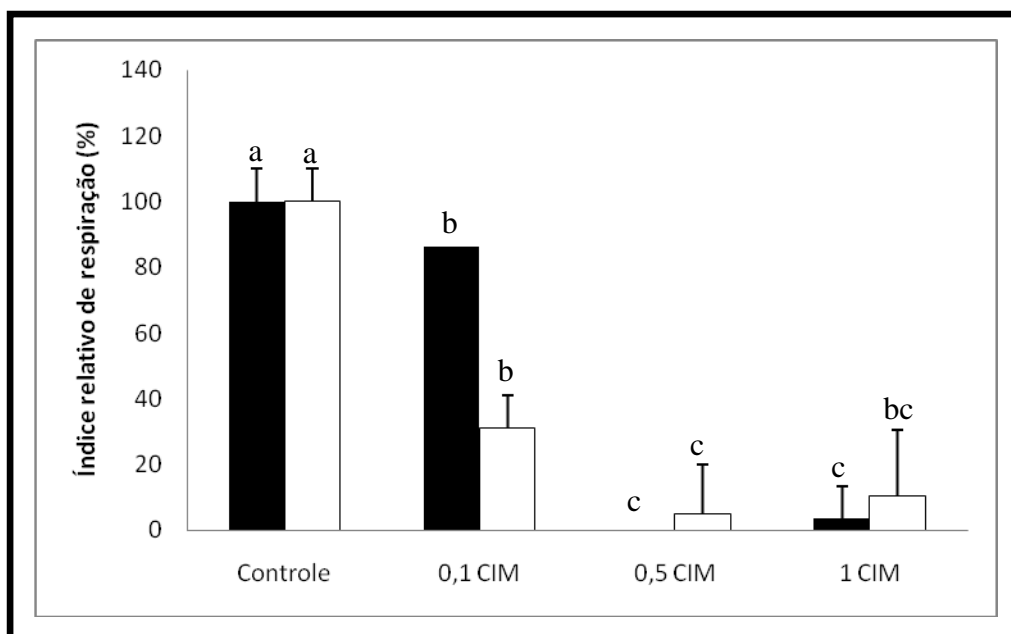


Figura 15. Índice relativo de respiração (%) de *Staphylococcus aureus*, na presença dos terpenoides citral ■ e citronelal □, nas concentrações correspondentes a controle (sem adição de terpenoides), 0,1, 0,5 e 1 CIM. Ao controle foi adicionado triton X-100 0,1%. Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

O caráter lipofílico dos terpenos pode dividir a fase aquosa da estrutura da membrana. Isso aumenta a fluidez e a permeabilidade da mesma, acarretando em distúrbio em suas proteínas, na inibição da respiração e na alteração do processo de transporte de íons. (Trombetta *et al.*, 2005). Uma vez que cada terpenoide apresenta uma estrutura particular, estas diferenças podem interferir diretamente sobre a membrana, afetando assim os resultados

4.7 Morte celular microbiana, lise celular e perda de componentes celulares causadas por terpenoides.

Os resultados apresentados na Figura 16 mostram que o citral, o citronelal, o geraniol e o citronelol reduziram a atividade redutora celular e/ou a viabilidade celular de *C. albicans* e *S. cerevisiae*. O corante azul de metileno utilizado nestes ensaios atua

como um indicador redox, apresentando-se de cor azul quando oxidado e incolor quando reduzido. Em leveduras este corante é usualmente aplicado para determinação de viabilidade celular. Entretanto, a redução do azul de metileno nestes microrganismos depende da ação de redutases, especialmente NADH dependentes, fato pelo qual células coradas em azul não implica obrigatoriamente em que estejam mortas, mas que têm a sua atividade redutásica reduzida ou completamente inibida. Apesar deste fato, no presente trabalho considerou-se que células sem atividade redutora, e portanto coradas em azul, encontravam-se mortas.

Dentre os compostos avaliados, citronelal e geraniol mostraram maior eficiência na redução de viabilidade celular de *C. albicans* (Figura 16) quando comparados com os demais terpenoides. Nos primeiros 60 minutos de teste, geraniol reduziu a viabilidade deste microrganismo em 100%, já citronelal em 90 minutos.

Apesar de ser menos efetivo que geraniol e citronelal, o terpenoide citral diminuiu de maneira gradativa a viabilidade de *C. albicans*. Ao final dos 180 minutos de teste, o número de células viáveis foi reduzido a zero. Com relação ao citronelol, aproximadamente 13% das células de *C. albicans* permaneceram viáveis após 3 horas de avaliação; sendo assim, este foi o composto menos eficiente diante desta levedura.

Os resultados indicam que geraniol, assim como ocorreu com *C. albicans*, foi o terpenoide mais eficiente na redução de *S. cerevisiae* quando comparado com os demais (redução de 100% de sobrevivência em 90 minutos). Citral e citronelal apresentaram declínio na viabilidade celular, e ao final do experimento cerca de 71 e 76% das células tratadas com citral e com citronelal, respectivamente, permaneceram viáveis. O composto citronelol apresentou inibição importante no que diz respeito à viabilidade celular uma vez que, cerca de 4% das células da levedura sobreviveram ao tratamento durante o teste.

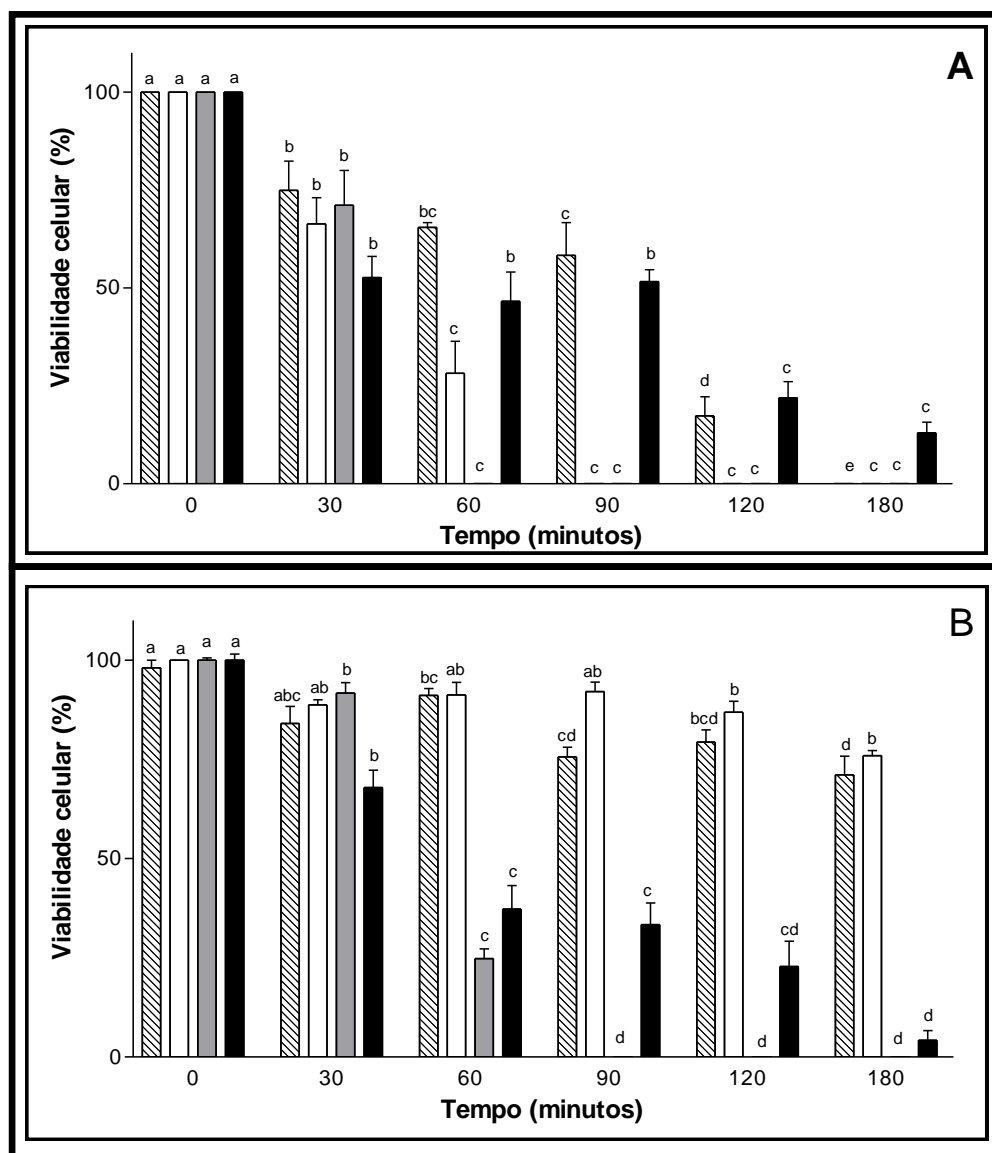






Figura 16. Percentual de células viáveis de *Candida albicans* (A) e *Saccharomyces cerevisiae* (B), tratadas com o valor correspondente a concentração inibitória mínima de citral , citronelal , geraniol  e citronelol . As médias \pm desvio padrão para triplicata são ilustradas. Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

Através de leitura espectrofotométrica, foi avaliada a lise celular de *C. albicans* e *S. cerevisiae* tratadas com os terpenoides citral, citronelal, geraniol e citronelol. Os

resultados (Figura 17) indicam que a maioria dos compostos não provoca a lise celular destes microrganismos.

Com base na Figura 17 fica evidente que citronelol não induz a lise celular de *C. albicans*. Lise celular pode ser observada com citral, citronelal e geraniol.

Pode ser observado que para citral e geraniol a lise de células de *S. cerevisiae* aconteceu de forma não significativa (Figura 17). Já citronelal e citronelol provocaram a lise celular deste microrganismo. Isso quer dizer que estes compostos não só matam as células desta levedura, mas também provocam a lise celular de aproximadamente 20% delas.

Estes resultados indicam que a redução da viabilidade (Figura 16) não é necessariamente acompanhada pela lise celular de *C. albicans* e *S. cerevisiae*. A morte celular pode ser atribuída a outro mecanismo de ação e não à ruptura celular.

Como já foi mencionado, a membrana celular pode ser significativamente diferente entre um organismo e outro, afetando a permeabilidade e, conseqüentemente, a sua resposta a compostos inibitórios (Sikkema *et al.* 1995). Isso parece explicar as diferenças encontradas entre *C. albicans* e *S. cerevisiae*.

Os resultados obtidos podem ser justificados por constatações feitas em estudos previamente realizados. Ensaio conduzido por Hammer *et al.* (2004) mostrou que terpenoides aumentam a permeabilidade celular e fluidez da membrana de leveduras e inibem a acidificação do meio. Segundo Sikkema *et al.* (1995), os terpenos são os responsáveis por induzir alterações na permeabilidade celular pela sua inserção entre os ácidos graxos da bicamada lipídica, desestruturando assim o empacotamento lipídico e causando desta forma modificações nas funções e propriedades da membrana. Tais modificações da membrana celular alteram as interações com solutos (Marquese & Dill, 1986). Além disso, alguns agentes antimicrobianos causam danos importantes na membrana e provocam a lise celular (Carson *et al.* 2002).

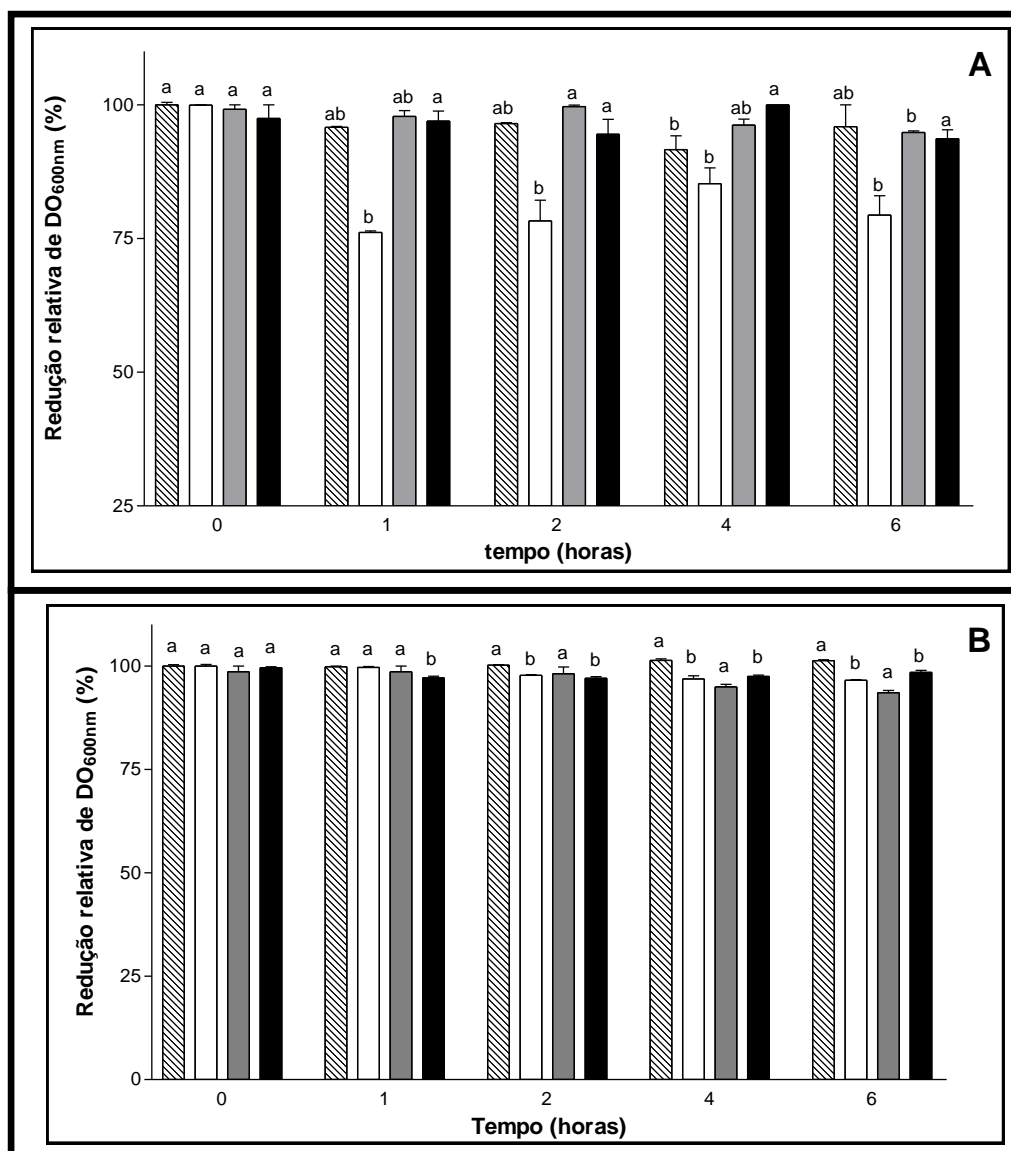


Figura 17. Avaliação de lise celular de *Candida albicans* (A) e *Saccharomyces cerevisiae* (B), induzida por citral citronelal , geraniol e citronelol , em função do tempo. Dados expressos em porcentagem em relação à DO_{600nm} do tempo 0. As médias ± desvio padrão para triplicata são ilustradas. *Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

A Figura 18 mostra que todos os terpenoides envolvidos neste teste provocam perda de componentes celulares de *C. albicans* e *S. cerevisiae*. Os valores mais expressivos foram observados com *S. cerevisiae*. Dentre os compostos mais efetivos

diante desta levedura, encontra-se o citral. Este monoterpeneo, quando comparado a citronelal, citronelol e geraniol foi consideravelmente mais eficiente no que diz respeito à perda de componentes intracelulares. Citral, na primeira hora de teste, já mostrava indícios importantes de que estava provocando a saída de componentes tais como DNA, RNA e proteínas de dentro da célula. Estas perdas para o meio externo aumentaram com o passar do tempo até se estabilizarem após 4 horas de teste. Foi observada perda de componentes celulares, causada por citronelal, geraniol e citronelol nos primeiros 60, 120 e 240 minutos de teste, respectivamente.

Citral também foi o composto mais eficaz diante de *C. albicans*. Na primeira hora de teste, este composto já mostrava sua eficiência. Assim como ocorreu com *S. cerevisiae*, a perda de componentes celulares foi aumentando de maneira gradativa até se estabilizar em 4 horas de teste. A perda de componentes celulares causada por citronelol aumentou de forma significativa em cada intervalo de tempo. Citronelal e geraniol também provocaram a perda de componentes celulares, mas de maneira menos eficiente que citral e citronelol.

Por serem hidrofóbicos, os terpenoides podem aderir aos lipídios da membrana celular, destruindo estruturas e tornando-as mais permeáveis (Knobloch *et al.* 1988, 1989; Sikkema *et al.* 1994). A perda de componentes celulares pode indicar danos graves e irreversíveis à membrana celular. Muitos compostos antimicrobianos que agem sobre a membrana celular induzem a perda de ácidos nucléicos (Carson *et al.* 2002), o que também pode ser observado no presente trabalho.

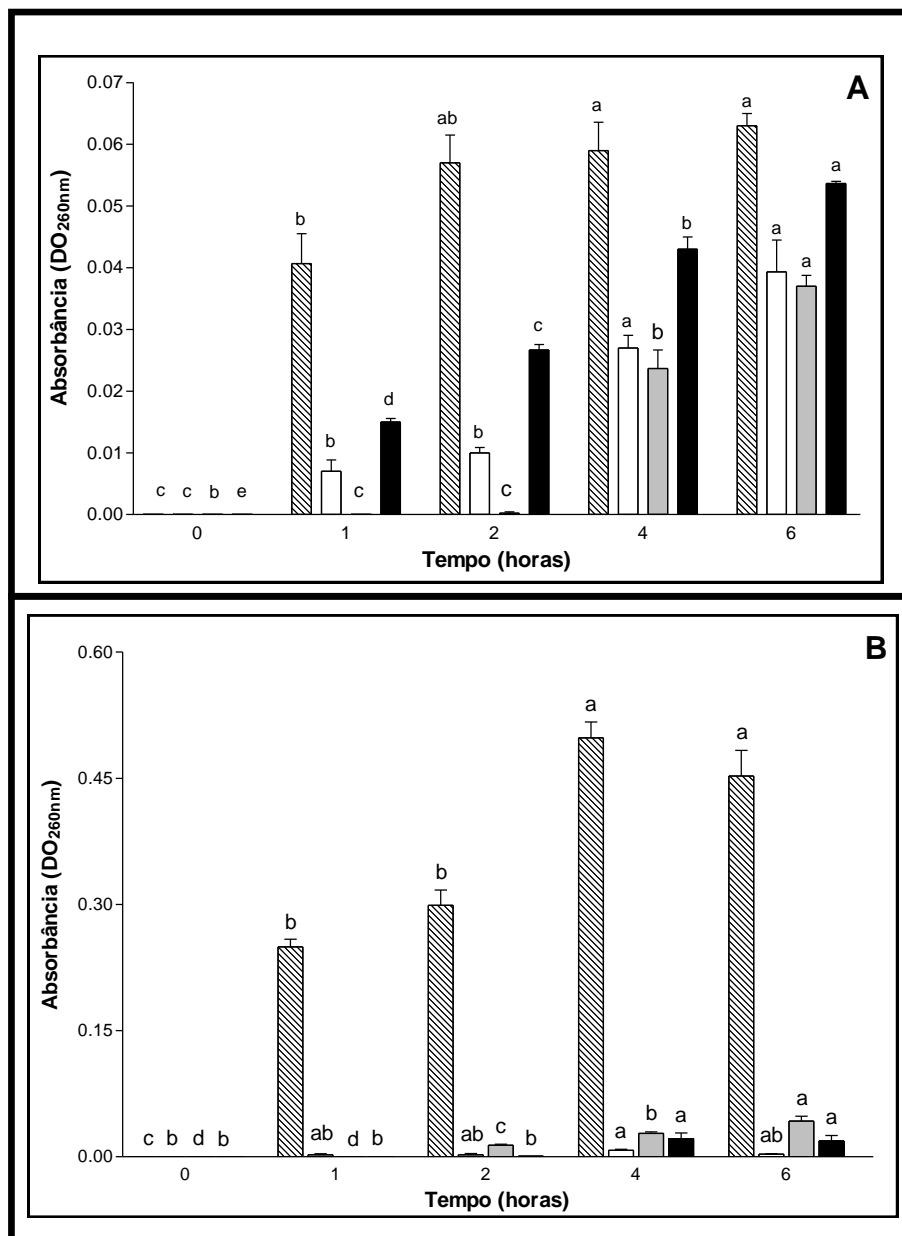


Figura 18. Perda de componentes celulares de *Candida albicans* (A) e *Saccharomyces cerevisiae* (B), tratadas com o valor correspondente a concentração inibitória mínima de citral , citronelal , geraniol e citronelol . As médias \pm desvio padrão para triplicata são ilustradas. Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

4.8 Atividade antioxidante de terpenoides

A atividade antioxidante *in vitro* dos terpenoides foi determinada pela capacidade de varredura do radical DPPH[•]. Os resultados apresentados na Tabela 4 indicam que o

terpenoide que exibiu maior atividade antioxidante foi o citral (IC50 $25,32 \pm 0,56$ $\mu\text{L}/\text{mL}$). O segundo terpenoide com maior atividade foi o citronelal (IC50 $69,92 \pm 0,08$ $\mu\text{L}/\text{mL}$). Por outro lado, o composto com menor atividade antioxidante foi α -terpineol (IC50 de $98,27 \pm 0,74$ $\mu\text{L}/\text{mL}$).

Já foi demonstrado (Rabbani *et al.* 2006) que o citral é capaz de varrer radicais livres, o que pode explicar os resultados obtidos neste ensaio. No presente trabalho, geraniol mostrou baixa capacidade antioxidante *in vitro* (IC50 $91,27 \pm 0,43$ $\mu\text{L}/\text{mL}$) quando comparado com os demais terpenoides analisados. Este resultado está de acordo com o encontrado por Perry *et al.* (2001), que apesar de ter utilizado método de inibição da peroxidação em cérebro de bovino, também mostrou que o geraniol apresenta baixo efeito antioxidante.

O terpenoide 1,8-cineol (IC50 de $86,07 \pm 6,27$ $\mu\text{L}/\text{mL}$) apresentou baixa atividade antioxidante, quando comparado com os demais terpenoides por Mustafa & Bektas (2008) e Burits *et al.* (2001), que analisaram este terpenoide pelo mesmo método de varredura do radical livre DPPH[•] e Perry *et al.* (2001) que ensaiou o 1,8-cineol utilizando o método de inibição da peroxidação de lipídios em cérebro de bovino.

Tabela 4. Percentual de redução do radical DPPH[•] e valor de IC50^{**} para os terpenoides.

Conc. $\mu\text{L}/\text{mL}$	Terpenoides					
	1,8 – cineol	Citronelal	α -terpineol	Citronelol	Citral	Geraniol
10	$0,00 \pm 0,00$	$5,98 \pm 0,18$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$26,16 \pm 0,53$	$2,23 \pm 0,09$
25	$5,93 \pm 1,20$	$11,26 \pm 0,45$	$0,00 \pm 0,00$	$5,35 \pm 2,40$	$49,30 \pm 2,15$	$8,34 \pm 0,86$
50	$10,23 \pm 0,42$	$28,49 \pm 0,36$	$1,49 \pm 0,19$	$6,71 \pm 0,09$	$89,32 \pm 0,81$	$8,75 \pm 0,28$
75	$11,74 \pm 1,88$	$47,09 \pm 0,27$	$3,11 \pm 1,73$	$26,45 \pm 0,77$	$91,78 \pm 0,35$	$9,43 \pm 0,10$
IC50 ^{**}	$86,07 \pm 6,27^a$	$69,92 \pm 0,08^b$	$98,27 \pm 0,74^c$	$85,12 \pm 1,13^a$	$25,32 \pm 0,56^d$	$91,27 \pm 0,43^a$

* Valores seguidos por letras distintas são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

** IC50: concentração de terpenoide ($\mu\text{L}/\text{mL}$) necessária para reduzir 50% do radical livre DPPH[•].

Nos ensaios de avaliação da atividade antioxidante *in vivo*, foram utilizados citral e citronelal, uma vez que estes foram os terpenoides com maior ação antioxidante *in vitro*. A concentração de citral utilizada foi de 0,0025 µL/mL e a de citronelal foi 0,015 µL/mL, sendo estas as maiores concentrações não citotóxicas à levedura (Tabela 5).

Tabela 5. Percentual de sobrevivência de *Saccharomyces cerevisiae* diante de citral e citronelal.

Terpenoides	Sobrevivência (%)				
	0,0025µL/mL	0,005 µL/mL	0,01 µL/mL	0,015 µL/mL	0,05 µL/mL
Citral	100	86,3	NC**	NC	NC
Citronelal	100	100	100	100	70

** NC – não calculado.

Os resultados (Figura 19) mostraram que o citronelal apresenta atividade antioxidante e o citral não. Normalmente, resultados de ensaios de atividade antioxidante *in vitro* diferem dos obtidos *in vivo*, pois neste último a permeabilidade e a possível metabolização dos compostos influenciam os resultados (Halliwell & Gutteridge, 200). É importante salientar que este é o primeiro trabalho que mostra que o citronelal apresenta significativa atividade antioxidante *in vivo*.

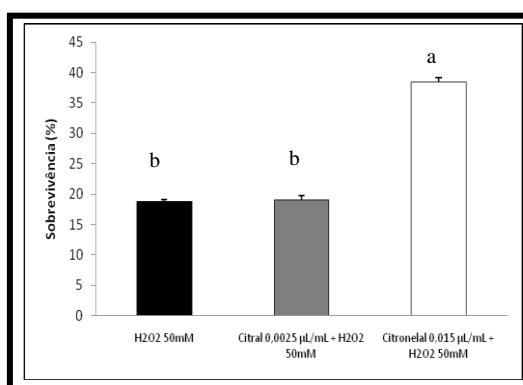


Figura 19. Percentual de sobrevivência da levedura *Saccharomyces cerevisiae* tratada com peróxido de hidrogênio 50 mM, citral 0,0025µL/mL+ H₂O₂ 50 mM e citronelal 0,015 µL/mL + peróxido de hidrogênio 50 mM. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

5. CONCLUSÕES

- Dentre os distintos terpenoides avaliados, citral foi o que apresentou maior espectro de ação sendo eficiente na inibição de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras.

- Além do citral, os compostos geraniol, citronelal, citronelol e α -terpineol mostraram eficiência na inibição de crescimento de bactérias Gram-positivas. Já para bactérias Gram-negativas, os monoterpenoides que reduziram a população microbiana foram geraniol e α -terpineol.

- Para leveduras, de todos os sete terpenoides avaliados, o composto menos eficiente foi β -cariofileno.

- Citral e geraniol reduziram, com diferenças no intervalo de tempo, a viabilidade de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras.

- O geraniol reduziu a sobrevivência das leveduras em um intervalo de tempo menor que o citral. Por este motivo, este composto mostrou ser mais eficiente.

- Quanto ao consumo de oxigênio, observou-se que a respiração de *Candida albicans* foi significativamente reduzida com a concentração correspondente a 0,1 CIM de citral, citronelal e citronelol. Geraniol, inibiu a respiração celular deste microrganismo na concentração de 0,5 CIM.

- As concentrações equivalentes a 0,1 CIM de geraniol e 0,5 CIM de citral, citronelal e citronelol reduziram de forma significativa a respiração de *Saccharomyces cerevisiae*.

- A taxa respiratória de *Salmonella typhimurium* e *Staphylococcus aureus* apresentou uma redução significativa quando na metade da CIM de citral e citronelal.

- Foi possível perceber que citral e geraniol não causaram lise celular de *Saccharomyces cerevisiae*. Porém, citronelal e citronelol induziram a lise celular deste microrganismo. Todos os terpenoides avaliados, com exceção do citronelol, provocaram lise celular de *Candida albicans*.

- A redução da viabilidade, avaliada pelo método de azul de metileno, observada em *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* não foi acompanhada pela lise celular. Isso indica que a morte celular pode ser atribuída a outro mecanismo de ação, e não à ruptura celular e consequente morte da mesma.

- Citral, citronelal, citronalol e geraniol provocaram perda de componentes celulares de *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*, sendo que o monoterpeneo citral foi consideravelmente mais eficiente no que diz respeito à perda de componentes intracelulares de *Saccharomyces cerevisiae*.

- O citral foi o terpenoide que apresentou maior atividade antioxidante *in vitro*, seguido por citronelal, citronelol, 1,8-cienol, geraniol e α -terpineol.

- Em ensaio *in vivo*, em *S. cerevisiae*, o citronelal mostrou maior efeito antioxidante que o citral.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amaral, J.A.; Ekins, A.; Richards, S.R.; Knowles, R. (1998). Effect of selected monoterpenes on methane oxidation, denitrification, and aerobic metabolism by bacteria in pure culture. **Applied and Environmental Microbiology**.64: 520-525.
- Amoroso, M.C.M. (2002). Uso e diversidade de plantas medicinais em Santo Antônio de Leverger, MT, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**. 16:189-203.
- Aureli, P.; Costantini, A.; Zolca, S. (1992). Antimicrobial activity of some plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**. 55: 344-348.
- Bajpai, V.K.; Al-Reza, S.M.; Choi, U.K.; Lee, J.H.; Kang, S.C. (2009). Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of leaf essential oil and extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Xu. **Food and Chemical Toxicology**. doi: 10.1016/j.fct.2009.04.043
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – a review. **Food and Chemical Toxicology**. 46: 446-475.
- Baratta, M.T.; Dorman, H.J.D.; Deans, S.G.; Biondi, D.M.; Ruberto, G. (1998a). Chemical composition, antimicrobial and antioxidative activity of laurel, sage, rosemary, oregano and coriander essential oils. **Journal of Essential Oils Research**. 10: 618-627.
- Baratta, M.T.; Dorman, H.J.D.; Deans, S.G.; Figueiredo, C.; Barroso, J.G.; Ruberto, G. (1998b). Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. **Flavor and Fragrance Journal**. 13: 235-244.
- Belletti, N.; Kamdem, S.S.; Patrignani, F.; Lanciotti, R.; Covelli, A.; Gardini, F. (2007). Antimicrobial Activity of Aroma Compounds against *Saccharomyces cerevisiae* and Improvement of Microbiological Stability of Soft Drinks as

Assessed by Logistic Regression. **Applied and Enviromental Microbiology**.
73(17): 5580-5586.

- Blaszyk, M.; Holley, R.A. (1998). Interaction of monolaurin, eugenol and sodium citrate on growth of common meat spoilage and pathogenic organisms. **International Journal of Food Microbiology**. 39 (3): 175-183.
- Bowles, B.L.; Juneja, V.K. (1998). Inhibition of foodborne bacterial pathogens by naturally occurring food additives. **Journal of Food Safety** 18: 101-112.
- Burits, M., Asres, K., Bucar, F., 2001. The antioxidant activity of the essential oils of *Artemisia abyssinica* and *Juniperus procera*. **Phytoterapia Research**. 15, 103–108.
- Carson, C.F; Mee, B.J.; Rilley, T.V. (2002). Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree oil) on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 46: 1914-1920.
- Conner, D.E.; Beuchat, L.R.(1984). Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeast. **Journal of Food Science**.49:429-434
- Cowan, M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Review**. 12: 564-582.
- Cox, S.D.; Mann, C.M.; Markham, J.L.; Bell, H.C.; Gustafson, J.E.; Warmingtn, J.R.; Wyllic, S.G. (2000). The mode of antimicrobial action of essential oils of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of Applied Microbiology**. 88: 170-175.
- Dani, C.; Oliboni, L.S.; Vanderlinde, R.; Pra, D.; Dias, J.F.; Yoneama, M.L.; Bonatto, D.; Salvador, M.; Henriques, J.A. (2009). Antioxidant activity and phenolic and mineral content of rose grape juice. **Journal of Medicinal Food**. 12(1): 188-92.

- Da Silva, C.deB. Guterres, S.S.; Weisheimer, V.; Schapoval, E. E. E. (2008). Antifungal Activity of the Lemongrass Oil and Citral Against *Candida* spp. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. 12 (1): 63-66.
- Deans, S.G.; Ritchie, G. (1987). Antibacterial properties of plant essential oils. **International Journal of Food Microbiology** 5: 165-180.
- Deans, S.G.; Svoboda, K.P.; Gundidza, M.; Brechany, E.Y. (1992). Essential oil profiles of several temperate and tropical aromatic plants: their antimicrobial and antioxidant activities. **Acta Horticulturae**. 306: 229-232.
- Delamare, A. P. L.; Pistorello, I.T.M. ; Atico, L.O.; Serafini, L.A.; Echeverrigaray, S. (2007). Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. **Food Chemistry**. 100: 603-608.
- Dewick, P.M. (2009). Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach. John Wiley & Sons. Ltd, UK. 540p.
- Dorman, H. G.; Deans, S.G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**. 88(2):308-16.
- Duke, J.A. (1994). **Biologically-Active compounds important spices, herbs and edible fungi**. Amsterdam: George Charalembours. 595p.
- Eggimann, P.; Garbino, J.; Pitte, D. (2003). Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. **The Lancet Infectious Diseases**. 3: 685-702.
- El- Sakhawy, F.S.; El-Tantawy, M. E.; Ross, S. A.; El-Sohly, M.A. (1998). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Murraya exotica* L. **Flavour and Fragrance Journal**. 13: 59-62.
- Elsom, G. K. F.; Hide, D. (1999). Susceptibility of methicillinresistant *Staphylococcus aureus* to tea tree oil and mupirocin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 43, 427–428.
- Espín, J.C.; Soler-Rivas, C.; Wichers, H.J. (2000). Characterization of the total free scavenger capacity of vegetable oils and oil fraction using 2,2 diphenyl –1-

- picrylhydrazyl radical. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 48: 648-656.
- Flores, D.V.; Carballho, C.R.; Ramos, E.R.; García, M.G.; Ochoa, R.R.; Pentón, J.G (2009). Inhibitory effect in vitro of five monoterpenes from essential oils on a *Rhizoctonia solani* isolate in potato (*Solanum tuberosum* L.). **Fitosanidad**. 13: 197-200
- Fukumoto, L.R.; Mazza, G. (2000). Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 48(8): 3597-3604.
- Gustafson, J.E.; Liew, Y.C.; Chew, S.; Markham, J.L., Bell, H.C.; Wyllic, S.G.; Warmington, J.R. (1998). Effects of tea tree oils on *Escherichia coli*. **Letters in Applied Microbiology**. 26,194-198.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. (2000). **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3 ed. Clarendon: Oxford.
- Hammer, K.A.; Carson, C.F.; Riley, T.V. (2004). Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tee tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Antimicrobial Chemoterapy**. 53: 1081-1085.
- Hao, Y.Y.; Brackett, R.E.; Doyle, M.P. (1998a). Efficacy of plant extracts in inhibiting *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* in refrigerated, cooked poultry. **Journal of Food Microbiology** 15(4): 367-378.
- Hao, Y.Y.; Brackett, R.E.; Doyle, M.P. (1998b). Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila* by plant extracts in refrigerated cooked beef. **Journal of Food Microbiology**. 61 (3): 307-312.
- Harris, R. (2002). Progress with superficial mycoses using essential oils. **International Journal of Aromatherapy**. 12: 83-91.

- Hayes, A.J.; Markovic, B. (2002). Toxicity of Australian essential oil *Backhousia citriodora* (Lemon myrtle). Part 1. Antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity. **Food and Chemical Toxicology**. 40: 535-543.
- Holetz, F.B.; Pessini G.L.; Sanches, N. R.; Cortez, D.A.G.; Nakamura, C.V.; Dias Filho, B.P. (2002). Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 97: 1027-1031.
- Höschle, B.; Jendrossek, D. (2005). Utilization of geraniol is dependent on molybdenum in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for different metabolic routes for oxidation of geraniol and citronellol. **Microbiology**. 151.
- Iijima, Y.; Gang, D.R.; Fridman, E.; Lewinsohn, E.; Pichersky, E. (2004). Characterization of geraniol synthase from the peltate glands of sweet basil. **Plant Physiology**. 134(1): 370-9
- Kim, A. S.; Nair, P. M. M. (1995). Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 43 (11): 2839-2845.
- Knobloch, K.; Pauli, A.; Iberl, B.; Weis, N.; Weigand, H. (1988). **Mode of action of essential oil components on whole cells of bacteria and fungi in plate tests**. In: P. Schreier (Ed.), **Bioflavour 87**. Berlin: Walter de Gruyter & Co. pp 287-299.
- Knobloch, K.; Pauli, A.; Iberl, B.; Weigand, H.; Weis, N. (1989). Antibacterial and antifungal properties of essential oils components. **Journal of Essential Oils Research**. (1): 119-128.
- Kobilinsky, A.; Nazer, A.I.; Dubois-Brissonnet, F. (2007). Modeling the inhibition of *Salmonella typhimurium* growth by combination of food antimicrobials. **International Journal of Food Microbiology**. 115 : 95-109.
- Kordali, S.; Cakir, A.; Mavi, A.; Kilic, H.; Yildirim, A. (2005). Screening of chemical composition and antifungal and antioxidant activities of the essential oils from

- three Turkish *Artemisia* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 53(5): 1408-1416.
- Lee, H.J.; Jeong, H.S.; Kim, D.J.; Noh, Y.H.; Yuk, D.Y.; Hong, J.T. (2008). Inhibitory effect of citral on NO production by suppression of iNOS expression and NF-kappa B activation in RAW264.7 cells. **Arch Pharmazie Research**. 3: 342-349.
- Lewinsohn, E.; Dudai, N.; Tadmor, Y.; Katzir, I.; Ravid, U.; Putievsky, E.; Joels, D. M. (1998). Histochemical Localization of Citral Accumulation in Lemongrass Leaves (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf., Poaceae). **Annals of Botany**. 81:35-39.
- Liolios, C.; Laouer, H.; Boulaacheb, N.; Gortzi, O.; Chinou, I. (2007). Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of Algerian *Phlomis bovei* De Noé subsp. *bovei*. **Molecules**. 12: 772-781.
- Lis-Balchim, M.; Deans, S. G. (1997). Bioactivity of selected plant oils against *Listeria monocitogenes*. **Journal of Applied Microbiology**. 82: 759-762.
- Magiatis, P.; Skaltsounis, A.L.; Chinou, I.; Haroutonian, S.A. (2002). Chemical composition and *in-vitro* antimicrobial activity of the essential oils of three Greek *Achillea* species. **Zeitschrift für Naturforschung**. 57c: 287-290
- Mangena, T.; Muyima, N.Y.O. (1999). Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential oils of *Artemisia afra*, *Pteronia incana* and *Rosmarinus officinalis* on selected bacteria and yeast strains. **Letters in Applied Microbiology**. 28, 291-296.
- Marino, M., Berani C., Comi, G. (2001). Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Laminaceae* and *Compositae*. **Internacional Journal of Food Microbiology**. 67:187-195.
- Marquese, J.A.; Dill, K.A. (1986). Solute partitioning into chain molecule intherphases: monolayers, bilayer membranes, and micelles. **Letters in Chemical Physiology**. 85: 434-444.

- Mesa-Arango, A.C.; Montiel-Ramos, J.; Zapata, B.; Durán, C.; Betancur-Galvis, L.; Stashenko, E. (2009). Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia Alba* (Mill.) N.E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 104 (6): 878-884.
- Mondello, F.; De Bernardis, F.; Girolamo, A.; Cassone, A.; Salvatore, G. (2006). In vivo activity of terpinen-4-ol, the main bioactive component of *Melaleuca alternifolia* Cheel (tea tree) oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic *Candida* species. **BMC Infectious Diseases**. 6:158
- Moreira, M. R.; Cruz, G. M. P.; Lopes, M. S.; Albuquerque, A. A. C.; Leal-Cardoso, J. H. (2001). Effects of terpineol on the compound action potential of the rat sciatic nerve. **Brazilian Journal of Medicinal and Biological Research**. 34: 1337-1340.
- Morita, M.; Shibuya, M.; Kushiro, T.; Masuda, K.; Yutuka, E. (2000). Molecular cloning and functional expression of triterpene synthases from pea (*Pisum sativum*). **European Journal of Biochemistry**. 267: 3453v-3460.
- Mustafa, K.; Bektas, T. (2008). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of three *Salvia* species from Turkish flora. **Bioresource Technology**. 99: 4096–4104
- Nascimento, G.G.F.; Locatelli, J; Freitas, P.C. (2000). Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**. 31: 247 – 256.
- Novgorodov, S.A.; Gudz, T.I. (1996). Permeability transition pore of the inner mitochondrial membrane can operate in two open states with different selectivities. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**. 28:139–146.
- Onawunmi, G.O. (1989). Evaluation of the antimicrobial activity of citral. **Letters in Applied Microbiology**. 9: 105-108.

- Outtara, B.; Sirmad, R.E.; Piette, G.J.P.; Begin, A. (1997). Antimicrobial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. **International Journal of Food Microbiology**. 37, 155-162.
- Pauli, A. (2001). Antimicrobial properties of essential oil constituents. **International Journal of Aromatherapy**. 11: 126-133.
- Perry, N. S.; Houghton, P. L.; Sampson, J.; Theobald, A. E.; Hart, S.; Lis-Balchin, M.; Houtt, J. R.; Evans, P.; Jenner, P.; Milligan, S.; Perry, E. K. (2001). In-vitro activity of *S. lavandulaefolia* (Spanish sage) relevant to treatment of Alzheimer's disease. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. 53(10): 1347-56.
- Rabbani, S. I.; Devi, K.; Khanam, S.; Zahra, N. (2006). Citral, a component of lemongrass oil inhibits the clastogenic effect of nickel chloride in mouse micronucleus test system. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**. 19 (2): 108-13.
- Rabello-Gay. (1991). **Mutagênese, carcinogênese e teratogênese: métodos e critérios de avaliação**. In: Nazareth, A.; Rabello-Gay, Regina Rodrigues, M. A. (Ed) **Sociedade Brasileira de Genética**. p241.
- Ramos, M.F.S. (2006). Desenvolvimento de microcápsulas contendo fração volátil de copaíba por spray-drying: estudo de estabilidade e avaliação farmacológica. **Tese de doutorado**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, SP
- Ramzi, A.A.M.; Salah A.A.A.; Sidgi, H.; Faisal, M.N.A.; Sama, A.Z.A.; Ulrike, L. (2008). Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities and phytochemical screening of some Yemeni medicinal plants. **eCAM**. 1-8.
- Raspor, P., Plesnicar, S., Gazdag, Z., Pesti, M., Miklavcic, M., Lah, B., Logar-Marinsek, R., Poljsak, B. (2005) Prevention of intracellular oxidation in yeast: the role of vitamin E analogue, Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylkroman-2- carboxyl acid). **Cell Biology International**. 29(1):57-63.

- Richter, C.; Schlegel, J. (1993). Mitochondrial calcium release induced by prooxidants. **Toxicology Letters**. 67, 119–127.
- Saito, Y.; Shiga, A.; Yoshida, Y.; Furuhashi, T.; Fujita, Y.; Niki, E. (2004). Effects of a novel gaseous antioxidative system containing a rosemary extract on the oxidation induced by nitrogen dioxide and ultraviolet radiation. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. 68(4): 781-6.
- Sadlon, A.E.; Lamson, D.W. (2010). Immune-modifying and antimicrobial effects of Eucalyptus oil and simple inhalation devices. **Alternative Medicine Review**. 15(1): 33-47.
- Sandri, I.G.; Zacaria, J.; Fracaro, F.; Delamare, A.P.L.; Echeverrigaray, S. (2007). Antimicrobial activity of the essential oils of Brazilian species of the genus *Cunila* against foodborne pathogens and spoiling bacteria. **Food Chemistry**. 103: 823-828.
- Santos, F.A.; Rao, V.S.N. (2001). 1,8- Cineol, a food flavoring agent, prevents ethanol-induced gastric injury in rats. **Digestive Diseases and Sciences** . 46: 331-337.
- Santos, F. A.; Silva, R. M.; Campos, A. R.; de Araújo, R. P.; Lima Júnior, R. C. P.; Rao, V. S. N. (2004). 1,8-cineole (eucalyptol), a monoterpene oxide attenuates the colonic damage in rats on acute TNBS-colitis. **Food and Chemical Toxicology**. 42: 579-584.
- Scola, G.; Conte, D.; Spada, P.W.D.S.; Dani, C.; Vanderlinde, R.; Funchal, C.; Salvador, M. (2010). Flavan-3-ol compounds from wine wastes with *in vitro* and *in vivo* antioxidant activity. **Nutrients**. 2: 1048-1059
- Seo, K.A.; Kim, H.; Ku, H.Y.; Ahn, H.J.; Park, S.J.; Bae, S.K.; Shin, J.G.; Liu, K.H. (2008). The monoterpenoids citral and geraniol are moderate inhibitors of CYP2B6 hydroxylase activity. **Chemico-Biological Interactions**. 174: 141-146.

- Sikkema, J., Bont, J.A.M.; Poolman, B. (1993). Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. **The Journal of Biological Chemistry**. 269: 8022-8028.
- Sikkema, J., Bont, J.A.M.; Poolman, B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiological Reviews**. 59:201-222.
- Simões, C. M. O.; Mentz, L. A.; Schenkel, E.P.; Irgang, B. E.; Stehmann, J.R. (1994). **Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul**. 4 ed. Porto Alegre: Editora da Universidade UFRGS.
- Simões, C.M.O.; Spitzer, V. (2000). **Óleos voláteis**. In: Simões, C.M.O. *et. al.* **Farmacognosia**. Porto Alegre: UFRGS. p 387-415.
- Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P.R. 2004. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC, 2001.
- Singh, K. V.; Shukla, N.P. (1984). Activity on multiple resistant bacteria of garlic (*Allium sativum*). Extract. **Fitoterapia** 55:313-315.
- Singh, H.P.; Mittal, S.; Kaur, S.; Batish, D.R.; Kohli, R.K. (2009). Characterization and antioxidant activity of essential oils from fresh and decaying leaves of *Eucalyptus tereticornis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 57: 6962-6.
- Skandamis, P.N., Nychas, G. J. E. (2000). Development and evaluation of model predicting the survival of *Escherichia coli* 0157:H7 NCTC 12900 in homemade eggplant salad at various temperatures, pHs, and oregano essential oil concentrations. **Applied of Environmental Microbiology**. 66: 1646-1653
- Smith-Palmer, A.; Stewart, J.; Fyfe, L. (1998). Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Letters in Applied Microbiology** 26:118-122

- Southwell, I. A.; Hayes, A.J.; Markaham, J.L.; Leach, D.N. (1999). The search for optimally bioactive Australian tea tree oil. **Acta Horticulturae**. 334:265-275
- Soares, D. G.; Andrezza, A. C.; Salvador, M. (2003). Sequestering ability of butylated hydroxytoluene, propyl gallate, resveratrol, and vitamins C and E against ABTS, DPPH, and hidroxil free radicals in chemical and biological systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 51(4): 1077-1080.
- Spada, P.K.W.D.S.; Salvador M. (2005) Antioxidant activity of the flavonoid hesperidin in chemical and biological systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 53(12):4757- 4761.
- Spada, P.W.D.S.; Souza, G.G.N.; Bertolini, G.V.; Henriques, J.A.P.; Salvador, M. (2008). Antioxidant, mutagenic, and antimutagenic activity of frozen fruits. **Journal of Medicinal Food**. 11(1): 144-51.
- Svoboda, K.P.; Deans, S.G. (1995). Biological activities of essential oils from selected aromatic plants. **Acta Horticulturae**. 390: 203-209.
- Tassau, C.; Koutsoumanis, K.; Nychas, G.J.E. (2000). Inhibition of *Salmonella enteriditis* and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil. **Food Research International**. 33: 273-280.
- Tepe, B.; Donmez, E.; Mehmet, U.; Candan, F.; Daferera, D.; Vardar-Unlu, G.; Polissiou M.; Sokmen A. (2004). Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* (Montbret et Aucher ex Benth.) and *Salvia multicaulis* (Vahl). **Food Chemistry**. 84:519-525
- Teplitski, M.; Robinson, J.B.; Bauer, W.D. (2000). Plants secrete substance that mimic bacterial N-acyl homoserine lactone signal activities and affect population density-dependent behaviors in associated bacteria. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. 13, 637-648.
- Tiwari, M. & Kakkar, P. (2009). Plant derived antioxidants – Geraniol and camphene protect rat alveolar macrophages against t-BHP induced oxidative stress. **Toxicology In Vitro**. 23(2): 295-301.

- Tozoni, D.; Zacaria, J.; Vanderlinde, R.; Delamare, A.P.L.; Echeverrigaray, S. (2010). Degradation of citronellol, citronellal and citronellyl acetate by *Pseudomonas mendocina* IBPse 105. **Electronic Journal of Biotechnology**. 13: 1-7.
- Trombeta, D.; Castelli, F.; Sarpietro, M.G.; Venuti, V.; Cristani, M.; Daniele, C.; Saija, A.; Mazzanti, G.; Bisignano, G. (2005). Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 49(6): 2474-2478.
- Turina, A. Del V.; Nolan, M.V.; Zygadlo, J.A.; Perillo, M.A. (2006). Natural terpenes: Self-assembly and membrane partitioning. **Biophysical Chemistry**. 122: 101-113.
- Valant-Vetschera, M. K.; Roitman, N. J.; Wollenweber, E. (2003). Chemodiversity of exudate flavonoids in some members of the *Lamiaceae*. **Biochemical Systematics and Ecology**. 31:1279-1289
- Vercesi, A. E.; Kowaltowski, A.J.; Grijalba, M.T.; Meinicke, A.R.; Castilho, R.F. (1997). The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. **Bioscience Reports**. 17: 43-52.
- Yamaguchi, T.; Takamura, H.; Matoba, T.C.; Terao, J. (1998). HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foos by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. 62: 1201-1204.
- Zgórká, G.; Glowniak, K. (2001). Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to the Lamiaceae family. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 26:79-87.
- Zhang, L.H. (2003). Quorum sensing and proactive host defense. **Trends in Plant Science**. 8: 238-244.
- Zwenger, S.; Basu, C. (2008). Plant terpenoids: applications and future potentials. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**. 3 (1): 001-007.

