



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA
PPG - BIONORTE**

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE
DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia origanoides* KUNTH (VERBENACEAE)**

SANDRA LAYSE FERREIRA SARRAZIN

**Belém - Pará
Novembro de 2015**

SANDRA LAYSE FERREIRA SARRAZIN

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE
DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia organoides* KUNTH (VERBENACEAE)**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE – Universidade Federal do Pará e Museu Paraense Emilio Goeldi, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Rosa Helena Veras Mourão
Co-orientador: Ricardo Bezerra de Oliveira

Belém - Pará
Novembro de 2015

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFOPA**

S247c Sarrazin, Sandra Layse Ferreira
Composição química, atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de *Lippia origanoides* KUNTH (VERBENACEAE) / Sandra Layse Ferreira Sarrazin. – Belém, 2015.
152 f. : il.
Inclui referências bibliográficas.
Orientadora Rosa Helena Veras Mourão ; co-orientador Ricardo Bezerra de Oliveira.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Pará e Museu Paraense Emílio Goeldi. Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE. Belém, 2015.

1. Essências e óleos essenciais. 2. Verbenácea – Amazônia. I. Mourão, Rosa Helena Veras, *orient.* II. Oliveira, Ricardo Bezerra de, *co-orient.* III. Título.

CDD: 23.ed. 615.321

Bibliotecário-documentalista: Rogério Aoyama CRB 2/1506

SANDRA LAYSE FERREIRA SARRAZIN

**Composição química, atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de
Lippia organoides kunth. (Verbenaceae)**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE - Universidade Federal do Pará e Museu Paraense Emilio Goeldi, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

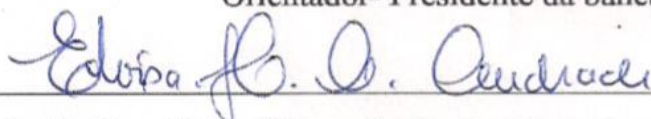
Orientadora: Profa. Dra. Rosa Helena Veras Mourão

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Bezerra De Oliveira

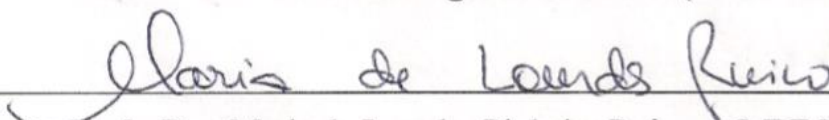
Banca examinadora



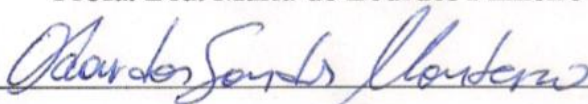
Profa. Dra. Rosa Helena Veras Mourão (UFOPA)
Orientador- Presidente da banca



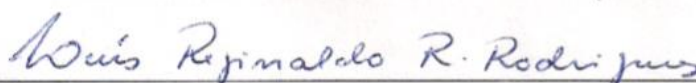
Profa. Dra. Eloisa Helena de Aguiar Andrade – (UFPA/MPEG)



Profa. Dra. Maria de Lourdes Pinheiro Ruivo – (MPEG)



Prof. Dr. Odair dos Santos Monteiro – (UFMA)



Prof. Dr. Luis Reginaldo Ribeiro Rodrigues – (UFOPA)

Belém - Pará

Novembro de 2015

DEDICATÓRIA

À minha família

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido Ricardo, agradeço por me fazer escolher os caminhos certos, não os mais fáceis e por estar sempre ao meu lado em cada momento bom ou ruim.

À Prof^a Dra. Rosa Helena Veras Mourão, pela paciência, dedicação e por ter me ensinado a “caminhar com meus próprios pés”.

À UFOPA - Universidade Federal do Oeste do Pará e ao laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental, pela possibilidade de realização deste trabalho.

Ao meu Co-orientador, Prof^o Dr. Ricardo Bezerra de Oliveira, pela contribuição nos momentos de reflexão da tese, sabendo criticar ou elogiar sempre nos momentos certos.

Ao Prof^o Dr. Edemilson Cardoso - Universidade Federal de Goiás, GO, pelo suporte ao desenvolvimento das microcápsulas.

À Universidade de Santander, Colômbia, em nome da Prof^a. Dra. Elena E. Stashenko e Victor Yased, pelo apoio na caracterização química do óleo essencial.

Ao Prof^o Dr. José Guilherme Soares Maia, que muito contribuiu em todas as etapas de produção dos artigos científicos.

Ao Prof^o Dr. Jean-Paul Bordineaud - Universidade de Bordeaux, França, pela oportunidade de estágio em seu laboratório e por me auxiliar nos experimentos de expressão gênica.

Ao Prof^o Dr. Luis Reginaldo Ribeiro Rodrigues, que cedeu seu laboratório para que pudéssemos realizar parte dos experimentos contidos neste trabalho.

A todos os meus amigos do grupo Labbex, pela ajuda no dia-a-dia do laboratório, pela amizade e companheirismo que nos faz vencer todos os obstáculos – Sinto orgulho de fazer parte desta equipe.

À Prof^a. Dra. Fátima Regina Gonçalves Salimena - Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, pela identificação botânica da espécie em estudo.

À Universidade Federal do Amazonas, sede do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte e ao Museu Paraense Emilio Goeldi, sede da cooredeação estadual da Rede Bionorte, pela oportunidade.

À CAPES, (Projeto Pesquisador Visitante Especial – PVE 2013, processo nº 88881.030472/2013-01), pelo financiamento da tese.

A todas as pessoas que contribuíram para a conclusão deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!!

*O que fazemos por nós, morre conosco, o
que fazemos pelos outros permanece e se torna imortal.*

(Autor desconhecido)

SARRAZIN, Sandra Layse Ferreira. **Composição química, atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de *Lippia origanoides* Kunth. (Verbenaceae), 2015.** 152 folhas. Tese de doutorado em Biotecnologia - Universidade Federal do Pará e Museu Paraense Emilio Goeldi, Belém, 2015.

RESUMO

O objetivo principal do presente trabalho foi avaliar a composição química, capacidade antioxidante e o potencial antimicrobiano do óleo essencial (OE) de *Lippia origanoides* Kunth (Verbenaceae) obtido por hidrosdestilação, bem como os riscos de toxicidade que podem ser apresentados por seu uso inadequado. A capacidade antioxidante do OE foi avaliada pelos ensaios de sequestro do radical DPPH e auto-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico. O potencial antibacteriano contra microorganismos contaminantes de alimentos foi avaliado pelos métodos padrões de disco-difusão em agar e microdiluição em caldo e o potencial quimiossensibilizante de concentrações sub-inibitórias do OE frente a leveduras do gênero *Candida* foi confirmado pela análise da expressão de genes envolvidos no sistema de defesa antioxidante, explorando respostas ao estresse oxidativo e mutagênico em *Saccharomyces cerevisiae*. Em adição, sabendo que a produção de componentes químicos em uma espécie é controlada por fatores externos como tipo de solo e condições climáticas, e que alterações químicas quantitativas e qualitativas podem influenciar diretamente em seu potencial biológico, realizamos coletas mensais de amostras de *L. origanoides* no decorrer de 12 meses, no intuito de avaliar a possível influência de variações sazonais sobre o rendimento e composição química do OE, bem como seu impacto sobre o potencial antimicrobiano. A análise da composição química foi realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), e os resultados foram correlacionados com os seguintes parâmetros climáticos: precipitação (mm), radiação solar (W/m^2), umidade relativa do ar (%) e temperatura ($^{\circ}C$). A toxicidade aguda do OE foi avaliada por determinação da DL_{50} . Sabendo ainda que os compostos presentes nos OE são passíveis de volatilização ou degradação, avaliamos a eficiência do processo de microencapsulação do OE de *L. origanoides* sobre a retenção de voláteis e manutenção do potencial antimicrobiano. A partir dos resultados obtidos, foi possível concluir que o OE de *L. origanoides* foi eficaz tanto no controle do crescimento de microorganismos quanto no retardo do processo de oxidação. O potencial antifúngico do OE de *L. origanoides* foi também confirmado frente a espécies do gênero *Candida*. Em concentrações sub-inibitórias, este óleo promoveu a expressão de genes envolvidos no estresse oxidativo e mutagênico, e o uso combinado do OE com Fluconazol

resultou num efeito sinérgico de ação antifúngica. Em adição, nossos resultados também demonstram que a variação sazonal ocorrida durante os 12 meses de coleta não alterou o rendimento médio do OE e exerceu pouca influência sobre sua composição química e potencial antimicrobiano, e que o processo de microencapsulação por *Spray drying* foi eficaz tanto na retenção dos principais constituintes voláteis quanto na manutenção do potencial antimicrobiano do OE de *L. origanoides*.

Palavras-chave: Óleo essencial, *Lippia origanoides*, composição química, atividade antimicrobiana, atividade antioxidante, microencapsulação.

SARRAZIN, Sandra Layse Ferreira, Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of *Lippia origanoides* Kunth. (Verbenaceae) essential oil, 152 pages. Doctoral thesis in Biotechnology - Universidade Federal do Pará e Museu Paraense Emilio Goeldi, Belém, 2015.

ABSTRACT

This work evaluated the chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of *Lippia origanoides* Kunth (Verbenaceae) essential oil (EO) obtained by hidrosdestillation, as well as evaluated the toxic risks that it may presents, because of a non proper use. The antioxidant activity of the *L. origanoides* oil was evaluated by the DPPH radical scavenging and β -carotene bleaching assay. The antibacterial potential against food microorganisms and the antifungal activity against *Candida* species were tested using disk diffusion and microdilution assay. To evaluate the antifungal chemosensitizing effect through induction of oxidative stress, cultures of the model yeast *Saccharomyces cerevisiae* tested. These cultures were exposed to sub-inhibitory concentrations of the *L. origanoides* EO, and the expression of genes known due ben over expressed in response to oxidative and mutagenic stress was analyzed by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) method. In addition, the chemical compounds production of one plant species is control by external factors, as soil type, climate conditions, and quantitative and qualitative chemical alterations may affect its biological potential. Thus, we sampled *L. origanoides* during 12 months, aim evaluating possible seasonal variations on the EO chemical composition and yield, as well as its effect on the EO antimicrobial potential. The chemical composition was analyzed using a gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The results were correlated to climate parameters: rain precipitation (mm), sun radiation (W/m^2), air humidity (%) and temperature ($^{\circ}C$). The EOessential oil acute toxicity was assayed by DL_{50} determination. In addition, the knowledge that the EO compounds are volatile or may be degraded, we evaluated the *L. origanoides* EO microencapsulation process efficiency on retention and maintenance of the antimicrobial potential. The results confirmed that the oil of *L. origanoides* could be utilized for the prevention of food bacterial growth, and as an antioxidative agent for retardation of food oxidation process. The *L. origanoides* EO antifungal potential was also confirmed opposite species of the genus *Candida*. In sub-inhibitory concentrations, this oil promoted the expression of genes involved in oxidative and mutagenic stress and the combined use of EO with fluconazole resulted in a synergistic antifungal effect. In addition, our results also show that the seasonal variation during the 12

months did not change the average yield of the EO and exerted little influence on its chemical composition and antimicrobial potential and that the microencapsulation process was effective in both the retention of the main volatile constituents as in maintaining the OE antimicrobial potential of *L. origanoides*.

Key words: Essential oil, *Lippia origanoides*, chemical composition, antimicrobial activity, antioxidant activity, microencapsulation.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 01 - *Lippia origanoides* Kunth (A). Detalhe da inflorescência (B)..... 28

CAPÍTULO II

- Figura 01- Percentual de inibição da atividade dos radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico em presença do óleo essencial de *Lippia origanoides*..... 89

CAPÍTULO IV

- Figura 01 - Rendimento (%) do óleo essencial de *L. origanoides* e variáveis climáticas mensuradas no momento da coleta: precipitação (mm); radiação solar (W/m^2); umidade relativa do ar (%) e temperatura ($^{\circ}C$)..... 122

CAPÍTULO V

- Figura 01 - Microcápsulas contendo óleo essencial de *Lippia origanoides*, obtidas por secagem em *Spray drier*, com bico aspersor de 0,7 mm, temperatura do ar de entrada de 160 $^{\circ}C$, e saída de 124 $^{\circ}C$. Alimentação por bomba peristáltica com fluxo aspersor de 45 L min^{-1} ; vazão do ar de secagem à 4 mL min^{-1} ; volume do fluxo do ar de 4 m³ min^{-1} e pressão de 60 psi. Sei: 5 kV, SS30, ampliação de 3.500x e escala de 5 μm 145

LISTA DE QUADROS E TABELAS

CAPÍTULO I

Quadro 01 -	Atividades farmacológicas atribuídas ao gênero <i>Lippia</i>	25
-------------	--	----

CAPÍTULO II

Tabela 01 -	Composição química do óleo essencial de <i>Lippia origanoides</i>	85
Tabela 02 -	Atividade antimicrobiana do óleo essencial de <i>L. origanoides</i> contra bactérias patogênicas relacionadas a alimentos.....	87
Table 03 -	Capacidade antioxidante do óleo essencial de <i>L. origanoides</i> (OELO) no ensaio de sequestro do radical DPPH.....	89

CAPÍTULO III

Tabela S1 -	<i>Primers</i> utilizados no ensaio de RT-PCR.....	103
Tabela 01 -	Composição química do óleo essencial de <i>Lippia origanoides</i> Kunth obtido de amostras coletadas em Santarém, PA, Brasil.....	104
Tabela 02 -	Potencial antifúngico do óleo essencial de <i>L. origanoides</i> contra espécies do gênero <i>Candida</i>	105
Tabela 03 -	Efeito do óleo essencial de <i>L. origanoides</i> (OELO) sobre o crescimento de células do modelo mutante <i>S. cerevisiae</i> Δ ycf1.....	107
Tabela 04 -	Efeitos do óleo essencial de <i>L. origanoides</i> sobre o sistema de defesa antioxidante e mutagênico, utilizando <i>S. cerevisiae</i> Δ ycf1 como modelo experimental.....	108
Tabela 05 -	Atividade antifúngica de concentrações sub-inibitórias do OE de <i>L. origanoides</i> em associação com Fluconazol contra <i>Candida</i> spp.....	111

CAPÍTULO IV

Tabela 01 -	Correlação entre o rendimento do óleo essencial de <i>L. origanoides</i> e parâmetros climáticos mensurados na área de coleta da planta: radiação solar, temperatura e umidade relativa do ar.....	123
Tabela 02 -	Rendimento e composição química do óleo essencial de <i>L. origanoides</i> obtido de amostras coletadas de Janeiro a Dezembro de 2012.....	124
Tabela 03 -	Potencial antimicrobiano do óleo essencial de <i>Lippia origanoides</i> obtidos no estudo sazonal (Janeiro a Dezembro de 2012).....	127
Tabela 04 -	Correlação simples entre a atividade antimicrobiana e os principais	

constituintes (carvacrol e timol) presentes no óleo essencial de <i>Lippia origanoides</i>	127
--	-----

CAPÍTULO V

Tabela 01 - Composição química do óleo essencial de <i>Lippia origanoides</i> antes e depois do processo de microencapsulação por <i>Spray drying</i>	146
Tabela 02 - Comparação entre a atividade antimicrobiana do óleo essencial de <i>L. origanoides</i> livre e microencapsulado contra microorganismos contaminantes de alimentos.....	148

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- ABS – absorvância
- ABTS - 2,2'-azino-bis-3-etilbenziazolina-6- ácido sulfônico
- AM - amido modificado
- AMP - ampicilina
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- ATCC - Coleção de Culturas Tipo Americana
- BAL - bactérias ácido lácticas
- BER - reparo excisão de bases
- BHA - butil-hidroxi-anisol
- BHT- butil-hidroxi-tolueno
- CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- CAT - catalase
- CBM - concentração bactericida mínima
- CCCD - coleção de culturas Cefar diagnósticos
- Cd²⁺ - cádmio
- CDC - Centers for Disease Control and Prevention
- cDNA - DNA complementar
- CESJ - Herbário Leopoldo Krieger - Universidade Federal de Juiz de Fora
- CFM - concentração fungicida mínima
- CG/EM - cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
- CIM - concentração inibitória mínima
- CN - caldo nutriente
- Ct - cycle threshold
- DD - disco difusão
- DE - equivalente dextrose
- DL₅₀ - dose letal 50
- DMAPP - dimetilalilpirofosfato
- DNA - ácido desoxirribonucleico
- dNTP - desoxirribonucleotídeos fosfatados
- DO - densidade óptica
- DP - desvio padrão da media
- DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
- EE - eficiência de encapsulação

EI - impacto eletrônico
EPM - erro padrão da média
ERNs - espécies reativas de nitrogênio
EROS - espécies reativas de oxigênio
eV - eletron volts
FDA - Food and Drug Administration
FFNSC - flavor and fragrance natural and synthetic compounds
FIOCRUZ - Fundação Osvaldo Cruz
FLU - fluconazol
FPP - difosfato de farnesila
FS - fluido supercrítico
g - grama
GA - goma arábica
GGPP - difosfato de geranyl geranila
GP - galato de propila
GPP - difosfato de geranila
GPS - Global Position System
GR - glutathione reductase
GSH - glutathione (γ -glutamyl-L-cysteinyl-glycine)
GSSG - glutathione oxidada
GST - glutathione S-transferase
H₂O - água
H₂O₂ - peróxido de hidrogênio
HIV - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
HO₂[•] - hidroperoxila
HOCl - ácido hipocloroso
HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência
IF-UFG Instituto de Física - Universidade Federal de Goiás.
IPP - isopentenildifosfato
IR - índice de retenção
Kg - quilograma
Km - quilômetros
L[•] - radical lipídico
LabMic - Laboratório Multi-usuário de Microscopia de Alta Resolução
LPS - lipopolissacarídeos

m - metros
m/m - massa/massa
m/z - massa/carga
MD - maltodextrina
MDA - malonaldeído
MEP - metileritriol fosfato
MEV - microscopia eletrônica de varredura
mg - miligrama
MHA - agar Mueller Hinton
MHC - caldo Mueller Hinton
min - minutos
mL - mililitro
mm - milímetro
mm – milímetros
MMR - reparo de erros de pareamento de bases
MVA - mevalonato
NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards
NER - reparo por excisão de nucleotídeos
NIST - Standard Reference Database
nm - nanômetros
NO - óxido nítrico
NO₂ - dióxido de nitrogênio
O₂^{•-} - radical superóxido
OELO - óleo essencial de *L. origanoides*
OE - óleos essenciais
OH[•] - radical hidroxila
OONO[•] - peroxinitrito
p/v - partes por volume
PAL - fenilalanina amonialiase
pH - potencial hidrogeniônico
PNPIC - Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
Prx – peroxirredoxinas
psi - libra força por plegada quadrada
qRT-PCR - reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
r² - coeficiente de correlação

RE - retículo endoplasmático
RNA - ácido ribonucéico
RNR - ribonuceotídeo redutase
RO[•] - alcoxila
ROO[•] - peroxila
rpm - rotações por minuto
SDA - agar sabouraud dextrose
seg - segundos
Se-Gpx - glutationa peroxidase
SOD - superóxido dismutase
SUS - Sistema Único de Saúde
THBP - terc-butil-hidroxi-quinona
Trx - tiorredoxina redutase
UFC - unidade formadora de colônia
UFOPA - Universidade Federal do Oeste do Pará
UV - radiação ultravioleta
W/m² - watt por metro quadrado
WHO - World Health Organization
YCF1 - yeast cadmium factor gene
YPD - extrato de levedura peptona-dextrose
°C - graus Celsius
µg - micrograma
µL - microlitro
µM - micro molar
µm - micrometro
¹O₂ - oxigênio singleto
³O₂ - oxigênio tripleto

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE QUADROS E TABELAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	viii

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO GERAL	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1. Óleos essenciais.....	20
2.2. Família Verbenaceae.....	23
2.3. O gênero <i>Lippia</i>	23
2.3.1. Atividades biológicas atribuídas ao gênero <i>Lippia</i>	24
2.4. A espécie <i>Lippia origanoides</i> Kunth (Verbenaceae).....	28
2.5. Potencial antimicrobiano de óleos essenciais.....	29
2.6. Deterioração de alimentos por microorganismos patogênicos.....	31
2.6.1 Mecanismos de resistência microbiana.....	33
2.7. Infecções causadas por espécies do gênero <i>Candida</i>	34
2.8. Estresse oxidativo e danos a biomoléculas.....	35
2.9. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como organismo modelo para análise de atividade antifúngica por estresse oxidativo.....	37
2.10. Oxidação lipídica em alimentos processados.....	39
2.11. Potencial antioxidante de óleos essenciais em produtos alimentícios.....	40
2.12. A tecnologia de microencapsulação como alternativa para retenção de voláteis bioativos presentes em óleos essenciais.....	41
2.13. Óleos essenciais e seus efeitos tóxicos ao organismo humano.....	44
2.14. A influência sazonal sobre a composição química e potencial biotecnológico de espécies vegetais.....	45
3. OBJETIVOS	
3.1. Geral.....	47
3.2. Específicos.....	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

LISTA DE PUBLICAÇÕES.....	76
----------------------------------	-----------

CAPÍTULO II

Composição química, atividades antioxidante e antimicrobiana do óleo essencial de <i>Lippia origanoides</i> Kunth (Verbenaceae), contra microorganismos patogênicos contaminantes de alimentos.....	77
Resumo.....	77
Abstract.....	78
1. Introdução.....	79
2. Material e métodos.....	80
2.1. Solventes e reagentes utilizados.....	80
2.2. Material vegetal.....	80
2.3. Extração do óleo essencial.....	80
2.4. Análise da composição química do óleo essencial.....	81
2.5. Ensaio de atividade antimicrobiana.....	81
2.5.1. <i>Microorganismos e condições de cultivo.....</i>	<i>81</i>
2.5.2. <i>Método de disco-difusão em agar.....</i>	<i>82</i>
2.5.3. <i>Método de microdiluição em caldo - Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) [13].....</i>	<i>82</i>
2.6. Ensaio de atividade antioxidante.....	83
2.7. Toxicidade oral aguda - determinação da DL ₅₀	84
3. Análises estatísticas.....	84
4. Resultados e discussão.....	84
4.1. Composição química do óleo essencial.....	84
4.2. Atividade antimicrobiana.....	86
4.3. Atividade antioxidante.....	88
4.4. Determinação da DL ₅₀	90
Conclusões.....	90
Referências.....	91

CAPÍTULO III

**Quimiossensibilização antifúngica através da indução do estresse oxidativo:
Um modelo para o controle da candidíase com base no óleo essencial de *Lippia***

<i>origanoides</i> Kunth.....	94
Resumo	94
Abstract	95
1. Introdução	96
2. Material e Métodos	97
2.1. Material vegetal.....	97
2.2. Extração do óleo essencial.....	97
2.3. Análise química do óleo essencial por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.....	97
2.4. Condições de cultivo de microorganismos e determinação da atividade antifúngica do OE de <i>L. origanoides</i>	98
2.4.1. Leveduras do gênero <i>Candida</i> e padronização do inocul.....	98
2.4.2. Determinação da atividade antifúngica do óleo essencial de <i>L. origanoides</i> em leveduras do gênero <i>Candida</i>	98
2.4.2.1 Método de disco-difusão em agar.....	99
2.4.2.2. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM).....	99
2.5. Potencial quimiosensibilizante do óleo essencial de <i>Lippia origanoides</i> por indução de estresse oxidativo.....	100
2.5.1. Microorganismo modelo e condições de cultivo.....	100
2.5.2. Determinação da concentração sub-inibitória do OE de <i>L. origanoides</i> sobre células de <i>S. cerevisiae</i>	100
2.5.3. Ensaio de PCR quantitativo em tempo real.....	100
3. Análises estatísticas	103
4. Resultados e Discussão	103
4.1. Composição química do óleo essencial de <i>L. origanoides</i>	103
4.2. Ensaio de atividade antifúngica do óleo essencial de <i>L. origanoides</i> em leveduras do gênero <i>Candida</i>	105
4.3. Efeito do OE de <i>L. origanoides</i> sobre o crescimento de <i>S. cerevisiae</i>	107
4.4. Indução dos genes de resposta ao estresse oxidativo e mutagênico no modelo mutante <i>S. cerevisiae</i> Δ ycf1 após exposição ao OE de <i>L. origanoides</i>	108
4.5. Quimiossensibilização antifúngica de concentrações sub-inibitórias do OE de <i>L. origanoides</i> em associação com Fluconazol frente a leveduras do gênero <i>Candida</i>	110
Conclusões	113

Referências.....	113
-------------------------	------------

CAPÍTULO IV

Avaliação antimicrobiana e sazonal do óleo essencial de <i>Lippia origanoides</i> Kunth, quimiotipo carvacrol.....	119
Resumo.....	119
Abstract.....	120
1. Introdução.....	121
2. Resultados e Discussão.....	122
2.1. Efeito da variação sazonal sobre o rendimento do óleo essencial.....	122
2.2. Efeito da variação sazonal na composição química do óleo essencial.....	123
2.3. Atividade antimicrobiana do óleo essencial.....	126
3. Seção experimental.....	128
3.1. Material vegetal.....	128
3.2. Dados climáticos.....	128
3.3. Processamento da planta e extração do óleo essencial.....	129
3.4. Análise da composição do óleo.....	130
3.5. Ensaio antimicrobiano.....	130
3.5.1. <i>Microorganismos e padronização do inóculo.....</i>	<i>130</i>
3.5.2. <i>Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e</i>	
<i>Concentração Bactericida Mínima (CBM).....</i>	<i>130</i>
3.6. Análises estatísticas.....	131
Conclusões.....	131
Referências.....	131

CAPÍTULO V

Influência do processo de microencapsulação do óleo essencial de <i>Lippia origanoides</i> sobre a retenção de voláteis e potencial antimicrobiano frente a bactérias contaminantes de alimentos.....	136
Resumo.....	136
Abstract.....	137
1. Introdução.....	138
2. Material e métodos.....	139

2.1. Reagentes utilizados.....	139
2.2. Material vegetal e extração do óleo essencial.....	139
2.3. Microencapsulação de óleo essencial por <i>Spray drying</i>	139
2.3.1. <i>Rendimento percentual de microcápsulas</i>	140
2.3.2. <i>Eficiência de encapsulação (EE)</i>	140
2.3.2.1. <i>Teor de óleo retido</i>	141
2.3.2.2. <i>Teor de óleo superficial</i>	141
2.3.2.3. <i>Elaboração da curva padrão</i>	141
2.4. Análise morfológica.....	142
2.5. Análise da composição química do OE livre e dos voláteis microencapsulados..	142
2.6. Atividade antimicrobiana do OE de <i>Lippia origanoides</i> microencapsulado contra bactérias contaminantes de alimentos.....	143
2.6.1. <i>Microrganismos e condições de cultivo</i>	143
2.6.2. <i>Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)</i>	143
3. Análises estatísticas	143
4. Resultados e discussão	144
4.1. Rendimento percentual e eficiência de encapsulação.....	144
4.2. Caracterização morfológica.....	144
4.3. Análise de retenção de voláteis.....	145
4.4. Atividade antimicrobiana de microcápsulas contendo óleo essencial de <i>L.</i> <i>origanoides</i>	147
Conclusões	149
Referências	149

ANEXOS

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO GERAL

A região Amazônica tem sido alvo de interesse de pesquisas científicas relacionadas ao estudo de sua biodiversidade e do conhecimento tradicional associado ao uso de plantas para fins biotecnológicos. Extratos vegetais, incluindo os óleos essenciais, têm recebido considerável atenção devido aos potenciais benefícios à saúde como agentes terapêuticos ou como conservantes, protegendo alimentos do processo de oxidação ou da deterioração por microorganismos potencialmente patogênicos. Entretanto, frente à magnitude da biodiversidade desta região, ainda são poucos os estudos realizados com o propósito de validar a eficácia de plantas medicinais e, principalmente, avaliar os possíveis efeitos tóxicos que podem causar sérios danos à saúde da população que delas faz uso.

Com o objetivo de contribuir com o conhecimento a cerca do potencial biotecnológico de plantas medicinais do norte do Brasil, o presente estudo avaliou a composição química, capacidade antioxidante e o potencial antimicrobiano do óleo essencial de *Lippia origanoides* Kunth (Verbenaceae), bem como os riscos de toxicidade que podem ser apresentados por seu uso inadequado. Para isso, a presente tese foi estruturada em 05 capítulos, sendo que neste apresento a contextualização da pesquisa, seguida dos objetivos propostos. Os capítulos seguintes foram escritos em forma de artigo científico, e seguem as normas das revistas onde foram ou serão publicados.

No Capítulo II, avaliamos a capacidade antioxidante e o potencial antimicrobiano do óleo essencial de *L. origanoides* contra microorganismos contaminantes de alimentos, e determinamos a toxicidade oral aguda do óleo essencial por determinação da DL₅₀.

No Capítulo III, o potencial quimiossensibilizante de concentrações sub-inibitórias do óleo essencial frente a leveduras do gênero *Candida* foi confirmado pela análise da expressão de genes envolvidos no sistema de defesa antioxidante, explorando respostas ao estresse oxidativo e mutagênico em *Saccharomyces cerevisiae*.

Em adição, sabendo que a produção de componentes químicos em uma espécie é controlada por fatores externos como tipo de solo e condições climáticas, e que alterações químicas quantitativas e qualitativas podem influenciar diretamente em seu potencial biológico, no Capítulo IV, avaliamos a possível influência de variações sazonais sobre o rendimento e composição química do óleo essencial de *L. origanoides* obtido de amostras mensais coletadas no decorrer de 12 meses, bem como seu impacto sobre o potencial antimicrobiano. A análise da composição química foi realizada por cromatografia gasosa

acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), e os resultados foram correlacionados com parâmetros climáticos como: precipitação (mm), radiação solar (W/m^2), umidade relativa do ar (%) e temperatura ($^{\circ}C$).

Sabendo ainda que os compostos presentes nos óleos essenciais são passíveis de volatilização ou degradação, no Capítulo V, avaliamos a eficiência do processo de microencapsulação do óleo essencial de *L. origanoides* sobre a retenção de voláteis e manutenção de seu potencial antimicrobiano, visando sua utilização para fins biotecnológicos. Ao final deste capítulo, seguimos com as considerações finais e itens anexados, os quais correspondem aos capítulos publicados na versão de artigo científico.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Óleos essenciais: características, composição química e principais usos.

Os óleos essenciais (OE), também chamados de óleos voláteis ou etéreos, são definidos como uma complexa mistura de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, oriundas do metabolismo secundário dos vegetais (Millezi et al., 2013). São biosintetizados em todos os órgãos da planta, incluindo flores, folhas, cascas, brotos, caules, galhos, sementes, frutos, raízes e madeira, e armazenados no interior de estruturas especializadas como células secretoras, cavidades, canais, células da epiderme ou tricomas glandulares (Bakkali et al., 2008, Teixeira et al., 2013). São geralmente incolores ou ligeiramente amarelados quando recentemente extraídos e possuem baixa estabilidade na presença de luz, calor, umidade e metais. A maioria dos OE possui índice de refração específico e são opticamente ativos, propriedades utilizadas na sua identificação e controle de qualidade. São solúveis em álcool e em solventes orgânicos apolares e pouco solúveis em água (Simões e Spitzer, 2007).

Na natureza, os OE desempenham diferentes funções ecológicas, agindo como substância de defesa contra fitopatógenos ou herbívoros; na atração de insetos polinizadores e dispersores de sementes; podem também contribuir com o desenvolvimento da planta, atuando como reguladores de crescimento e ainda auxiliar na proteção contra perda de água e aumento da temperatura (Mcgarvey e Croteau, 1995; Pichersky e Gershenzon, 2002; Tholl, 2006; Teixeira et al., 2013).

São constituídos por substâncias químicas de baixo peso molecular, tais como: hidrocarbonetos terpênicos (mirceno, terpineno, α e β -pineno, sabineno), alcoóis (linalol,

mentol), cetonas (pinocarvona, mentona), fenóis (carvacrol, timol), éteres (eucaliptol, mentofurano) ou ésteres (acetato de linalila, acetato de isobornila), aldeídos (ex: citral, citronelal), lactonas (ex: nepetalactona), cumarinas e compostos contendo enxofre. Os OE podem compreender mais de 60 componentes individuais, distribuídos entre diferentes classes químicas, onde dois a três componentes apresentam-se em concentrações bastante elevadas, e os demais componentes apresentam-se em quantidades vestigiais (Dorman e Deans, 2000; Simões e Spitzer, 2007). Estes componentes incluem dois grupos de origem biossintética distinta; sendo o maior grupo composto por terpenos e terpenóides e o outro de componentes aromáticos e alifáticos. Os derivados terpênicos são formados pela via do ácido mevalônico e os compostos aromáticos, formados pela via do ácido chiquímico (Bakalli et al., 2008; Park et al., 2009).

A via biosintética dos terpenos é dividida em várias etapas, que iniciam com a síntese do precursor isopentenildifosfato (IPP) e sua isomerização à dimetilalil pirofosfato (DMAPP) seguida da formação do esqueleto terpênico e modificações enzimáticas secundárias (reação redox) do esqueleto para atribuir propriedades funcionais aos diferentes terpenos (Bohlmann et al., 1998). As moléculas de IPP são sintetizadas a partir de duas vias biossintéticas distintas: a via clássica ou via do mevalonato (MVA), responsável pela formação dos sesquiterpenos e triterpenos, que ocorre preferencialmente no citosol e cujos precursores são piruvato e acetilcoenzima A; e a via alternativa ou via do metileritritol fosfato (MEP), que origina os monoterpenos, diterpenos e tetraterpenos que ocorre preferencialmente nos plastídeos e tem como precursores piruvato e gliceraldeído-3-fosfato (Adam e Zapp, 1998; Jux et al., 2001; Wanke et al., 2001; Nugroho e Verpoorte, 2002).

A formação dos terpenos inicia-se a partir da junção de uma molécula de IPP a seu isômero DMAPP, dando origem ao difosfato de geranila (GPP), precursor dos monoterpenos (C₁₀). À medida que são adicionadas unidades de IPP, formam-se o difosfato de farnesila (FPP), precursor dos sesquiterpenos (C₁₅) e o difosfato de geranil geranila (GGPP), precursor dos diterpenos (C₂₀). Estas estruturas são posteriormente modificadas por enzimas (hidroxilases, desidrogenases, redutases e glicosil, metil e acil transferases), que juntas geram uma série de compostos diferentes e dão origem aos compostos presentes nos óleos essenciais. Os triterpenos (C₃₀) são formados pela junção de duas unidades FPP e os tetraterpenos (C₄₀) pela junção de duas unidades GGPP (Bohlmann et al., 1998; Nugroho e Verpoorte, 2002). Dos diferentes terpenos existentes, os monoterpenos são as moléculas mais representativas, constituindo 90 % dos óleos essenciais (Bakkali et al., 2008).

O segundo grupo, originado da via do ácido chiquímico é constituído por compostos com uma cadeia lateral de três átomos de carbono derivados de aminoácidos aromáticos. Nesta via, a partir do ácido chiquímico, é produzido o aminoácido fenilalanina que, por ação da enzima fenilalanina amonialiase (PAL) forma o ácido cinâmico e ácido *p*-cumárico. A redução da cadeia lateral destes ácidos leva à formação de propenilbenzenos e alilbenzenos, esqueletos carbônicos dos fenilpropanóides; por meio de oxidações com degradação das cadeias laterais geram aldeídos aromáticos e ciclizações enzimáticas intramoleculares produzem cumarinas (Simões e Spitzer, 2007).

A composição química dos OE pode variar segundo sua localização no vegetal; ou quando extraído de um mesmo órgão, de uma mesma espécie vegetal, pode variar consideravelmente, de acordo com parâmetros climáticos, variações de nutrientes do solo (Masotti et al., 2003; Burt et al., 2005; Tavares et al., 2005; Apel et al., 2006); ou por fatores agronômicos como irrigação, adubação e época de colheita (Kerrola et al., 1994; Nascimento et al., 2007). Outros fatores tais como temperatura de secagem (Carvalho Filho et al., 2006) armazenamento da planta, método de extração, armazenamento do óleo e as condições de análise utilizadas para a identificação de compostos também podem influenciar na composição química dos OE (Daferera et al., 2000).

Os OE podem ser obtidos por diferentes técnicas, tais como: hidrodestilação, arraste a vapor, prensagem a frio do pericarpo de frutos cítricos (Bizzo et al., 2009), extração por fluidos supercríticos, extração por solventes (Santos et al., 2004; Semen e Hiziroglu, 2005) e a enfleurage, usada principalmente pela indústria de perfumes (Bakkali et al., 2008). O método de extração por arraste a vapor é mais comumente usado na produção comercial de OE (Burt, 2004) e a hidrodestilação é o processo mais utilizado em escala laboratorial (Santos et al., 2004).

A cromatografia gasosa consiste na principal técnica utilizada para determinar a composição química de OE. Essa técnica é um dos processos mais difundidos para análises químicas, por ser uma técnica de separação eficiente para determinar a estrutura química, tanto na indústria quanto nos laboratórios de pesquisa científica (Senatore, 1996; Marino et al., 2001).

Atualmente os OE tem despertado o interesse de pesquisadores ao redor do mundo por apresentarem potencial para o desenvolvimento de fitomedicamentos com diferentes propriedades curativas. Além de apresentarem eficácia contra um significativo número de microorganismos patogênicos, os OE ou seus compostos isolados têm exibido

propriedades citoprotetoras (Sylvestre et al., 2006), antinociceptiva e anti-inflamatórias (Santos et al., 1998; Silva et al., 2003), antivirais (Allahverdiyev et al., 2004; Garozzo et al., 2009), antioxidantes (Acevedo et al., 2007), inseticida (Ayvaz et al., 2010), antiparasitária (Asha et al., 2001; Pessoa et al., 2002), antispasmódica, larvicida (Pavela, 2009), antiplasmódica (Benoit-Vical et al., 2003), gastroprotetora (Santos e Rao, 2001), entre outras.

Outro campo de interesse crescente é a utilização de OE obtidos de plantas condimentares e medicinais, como uma alternativa quanto à utilização de aditivos químicos em alimentos processados. Diferentes autores descrevem o potencial de OE em inibir o crescimento de bactérias deteriorantes de alimentos e ao mesmo tempo atuar como antioxidantes naturais (Senthilkumar e Venkatesalu, 2013; Roby et al., 2013; Bouzidi et al., 2013).

Nesse contexto, destaca-se a família Verbenaceae, com espécies produtoras de OE, cujas propriedades biológicas vêm sendo comprovadas cientificamente para diferentes fins terapêuticos, incluindo seu potencial como antioxidante natural (Shikanga et al., 2010; Zeni et al., 2013) e a ação antimicrobiana contra diferentes microorganismos potencialmente patogênicos (Oliveira et al., 2007; Aguiar et al., 2008; Ara et al., 2009; Singh et al., 2010).

2.2. Família Verbenaceae

A família Verbenaceae compreende aproximadamente 175 gêneros e 2.800 espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, principalmente na zona temperada do hemisfério sul (Aguiar e Costa, 2005). No Brasil ocorrem aproximadamente 17 gêneros e 250 espécies (Souza e Lorenzi, 2005).

Algumas espécies desta família têm seu potencial econômico amplamente explorado, sendo utilizadas tanto como espécies ornamentais quanto para fins terapêuticos. Neste último caso, a investigação é feita em busca dos componentes bioativos dos OE (Santos, 2009). Os principais gêneros que incluem espécies medicinais são *Lippia*, *Verbena* e *Stachytarpheta* (Di Stasi et al., 2002).

2.3. O gênero *Lippia*

O gênero *Lippia* inclui cerca de 200 espécies entre ervas, arbustos e pequenas árvores, que podem ser encontradas na América do Sul e Central e África Tropical. (Pascual et al., 2001; Monteiro et al., 2007; Leitão et al., 2008; Linde et al., 2010). Grande parte das espécies pertencentes a este gênero ocorre no Brasil, México, Paraguai e Argentina, com

poucas espécies endêmicas na África. No Brasil, o gênero *Lippia* é representado por aproximadamente 120 espécies, sendo principalmente localizadas nos Estados de Minas Gerais, Goiás e Bahia (Gomes et al., 2011).

Segundo Oliveira e colaboradores (2006a), espécies do gênero *Lippia* apresentam semelhanças morfológicas durante o período de floração e são caracterizadas por sua fragrância, em geral, forte e agradável. Destas espécies, *L. alba* (Mill.) N. E. Brown (erva cidreira ou falsa melissa) é a mais conhecida e utilizada devido as suas propriedades medicinais (Gomes et al., 2011).

Algumas espécies deste gênero são utilizadas como tempero de alimentos ou usadas tradicionalmente contra disfunções gastrointestinais e respiratórias (Pascual et al., 2001); outras são utilizadas contra estados de excitação, náuseas e hipertensão (Di Stasi et al., 2002; Hennebelle et al., 2008). Em muitos casos, as partes utilizadas são folhas e flores, as quais são comumente preparadas na forma de infusão ou decocção; administradas oralmente na forma de chá, ou utilizadas como emplastos e lavagens para ferimentos (Lorenzi e Matos, 2002).

Os principais constituintes químicos encontrados nos OE de espécies do gênero *Lippia* são: α -pineno, *p*-cimeno, limoneno, β -cariofileno, linalol, cânfora, carvacrol e timol. Entre estes, carvacrol e timol são caracterizados como potenciais agentes antimicrobianos (Kunle et al., 2003; Nostro et al., 2004, 2007; Trombetta et al., 2005; Kordali et al., 2008; Liolios et al., 2009; Rivas et al., 2010). Entre os componentes não-voláteis, foram registrados alcalóides, flavonóides, iridóides, naftoquinonas, saponinas e triterpenos (Pascual et al., 2001).

2.3.1. Atividades biológicas atribuídas ao gênero *Lippia*

Muitas espécies pertencentes a este gênero apresentam propriedades medicinais comprovadas e são utilizadas em diversos municípios brasileiros que adotam Programas de Fitoterapia em atenção primária à saúde. *Lippia sidoides*, por exemplo, foi introduzida em programas de fitoterapia, após validação científica de seu potencial farmacológico (Matos e Oliveira, 1998).

O quadro 01 sumariza as publicações referentes às atividades farmacológicas atribuídas a espécies pertencentes ao gênero *Lippia* no período compreendido entre 1990 a 2015. A busca de artigos foi realizada através do portal de periódicos da CAPES, e através dos bancos de referência: Pubmed, Science Direct, Scopus e Scielo. Para isso, foram utilizados os descritores *Lippia*, atividade biológica e *biological activities*.

Quadro 01 - Atividades biológicas atribuídas ao gênero *Lippia*

Atividade biológica	Espécie	Autores (ano de publicação)
Gastroprotetora	<i>L. sidoides</i> <i>L. citriodora</i> <i>L. integrifolia</i>	Monteiro et al. (2007) Marcial et al. (2014) Tajik et al. (2015)
Antiinflamatória	<i>L. sidoides</i> <i>L. nodiflora</i> <i>L. geminata</i> <i>L. gracilis</i> <i>L. citriodora</i> <i>L. multiflora</i> <i>L. javanica</i>	Forestieri et al. (1996) Abena et al. (2003) Monteiro et al. (2007) Mendes et al. (2010) Guilhon et al. (2011) El-Hawary et al. (2012) Bayala et al. (2014) Dzoyem e Eloff. (2015)
Antinociceptiva	<i>L. gracilis</i> <i>L. grata</i> <i>L. alba</i>	Guilhon et al. (2011) Carmona et al. (2013) Siqueira-Lima et al. (2014)
Antiséptica	<i>L. sidoides</i>	Pascual et al. (2001)
Antiprotozoário	<i>L. origanoides</i> <i>L. sidoides</i> <i>L. graveolens</i>	Escobar et al. (2010) Borges et al. (2012) Farias-Júnior et al. (2012) Quintanilla-Licea et al. (2014)
Cicatrizante	<i>L. sidoides</i>	Pascual et al. (2001)
Larvicida	<i>L. sidoides</i>	Carvalho et al. (2003)
Antimicrobiana	<i>L. sidoides</i> <i>L. turbinata</i> <i>L. alba</i> <i>L. javanica</i> <i>L. grandis</i> <i>L. multiflora</i> <i>L. dulcis</i> <i>L. formosa</i> <i>L. gracilis</i> <i>L. grandifolia</i> <i>L. microphylla</i> <i>L. nodiflora</i> <i>L. palmeri</i> <i>L. ukambensis</i> <i>L. graveolens</i>	Lemos et al. (1990) Caceres et al. (1991) Dimayuga e Garcia (1991) Lemos et al. (1992) Lacoste et al. (1996) Pinto et al. (1996) Hernández et al. (2000) Kunle et al. (2003) Bassole et al. (2003) Manenzhe et al. (2004) Oladimeji et al. (2004) Pessoa et al. (2005) Oskay et al. (2005) Duarte et al. (2005) Oliveira et al. (2006b)

	<i>L. origanoides</i> <i>L. chevalieri</i> <i>L. triphylla</i> <i>L. wilmsii</i> <i>L. rugosa</i> <i>L. scaberrima</i> <i>L. rehmannii</i> <i>L. salviaefolia</i> <i>L. velutina</i> <i>L. balansae</i> <i>L. lasiocalycina</i> <i>L. lupulina</i> <i>L. berlandieri</i>	Botelho et al. (2007) Fontenelle et al. (2007) Oliveira et al. (2007) Mevy et al. (2007) Aguiar et al. (2008) Regnier et al. (2008) Ara et al. (2009) Tatsadjieu et al. (2009) Shukla et al. (2009) Sánchez et al. (2009) Regnier et al. (2010) Linde et al. (2010) Neto et al. (2010) Silva et al. (2010b) Shikanga et al. (2010) Castro et al. (2011) Betancur-Galvis et al. (2011) Reis et al. (2011) Ortega-Nieblas et al. (2011) Tangarife- Castaño et al. (2011) Sarrazin et al. (2012) Funari et al. (2012) Oyourou et al. (2013) Pinto et al. (2013) Guimarães et al. (2014) Veras et al. (2014) Azevedo et al. (2014) Sánchez et al. (2014) Andrade et al., (2014) Freires et al. (2015a) Freires et al. (2015b) Sutili et al. (2015) Sarrazin et al. (2015)
Antiviral	<i>L. multiflora</i> <i>L. alba</i> <i>L. citriodora</i> <i>L. origanoides</i>	Abad et al. (1999) Andrighetti-Frohner et al. (2005) Menezes et al. (2009) Ocazionez et al. (2010)
Repelente	<i>L. origanoides</i> <i>L. sidoides</i> <i>L. gracilis</i>	Caballero-Gallardo et al. (2012) Nerio et al. (2009) Dias et al. (2015)
Analgésica	<i>L. nodiflora</i>	Forestieri et al. (1996)

	<i>L. geminata</i> <i>L. gracilis</i> <i>L. multiflora</i>	Abena et al. (2003) Mendes et al. (2010)
Antipirética	<i>L. nodiflora</i> <i>L. geminata</i> <i>L. citriodora</i> <i>L. multiflora</i>	Forestieri et al. (1996) Abena et al. (2003) El-Hawary et al. (2012)
Coletérica	<i>L. integrifolia</i>	Gorzalczany et al. (2008)
Antiespasmódica	<i>L. integrifolia</i> <i>L. sidoides</i> <i>L. grata</i> <i>L. chamissonis</i> <i>L. dulcis</i> <i>L. alba</i>	Souza Brito e Souza Brito, (1993) Gorzalczany et al. (2008) Görnemann et al. (2008) Blanco et al. (2013)
Antimalárica	<i>L. multiflora</i> <i>L. chevalieri</i> <i>L. javanica</i>	Gasquet et al. (1993) Valentin et al. (1995) Mallie e Bastide (1995) Clarkson et al. (2004)
Antielmíntica	<i>L. sidoides</i>	Camurça-Vasconcelos et al. (2008)
Acaricida	<i>L. origanoides</i> <i>L. gracilis</i> <i>L. alba</i>	Sivira et al. (2011) Cruz et al. (2013) Peixoto et al. (2015)
Antioxidante	<i>L. sidoides</i> <i>L. nodiflora</i> <i>L. origanoides</i> <i>L. graveolens</i> <i>L. berlandieri</i> <i>L. alba</i> <i>L. multiflora</i> <i>L. microphylla</i> <i>L. javanica</i> <i>L. wilmsii</i> <i>L. schomburgkiana</i> <i>L. grandis</i> <i>L. citriodora</i>	Stashenko et al. (2003) Monteiro et al. (2007) Acevedo et al. (2007) David et al. (2007) Rocha-Guzmán et al. (2007) Silva et al. (2009) Sánchez et al. (2009) Almeida et al. (2010) Ashokkumar et al. (2010) Olivero-Verbel et al. (2010) Shikanga et al. (2010) Arthur et al. (2011) Damasceno et al. (2011) El-Hawary et al. (2012) Quirantes-Piné et al. (2013) Bayala et al. (2014) Dzoyem e Eloff, (2015)
Antimutagênica	<i>L. alba</i> <i>L. origanoides</i>	Ramos et al. (2003) Vicuña et al. (2010)

Embora muitas espécies deste gênero já tenham sido estudadas do ponto de vista farmacológico, outras necessitam de estudos investigativos que possam comprovar seu potencial medicinal. Dentre estas, destaca-se a espécie *Lippia origanoides* Kunth, que apesar de utilizada na medicina popular, tem seu potencial biológico pouco estudado.

2.4. A espécie *Lippia origanoides* Kunth (Verbenaceae)

L. origanoides (Figura 1), conhecida na região Norte do Brasil como “salvia-de-Marajó” ou “alecrim d’angola”, é uma espécie nativa de alguns Países da América Central (México, Guatemala e Cuba) e Norte da América do Sul, especialmente na região amazônica (Guiana, Venezuela, Brasil e Colômbia) (Oliveira et al., 2007; Vicuña et al., 2010; Betancur-Galvis et al., 2011). A espécie é utilizada como tempero na preparação de alimentos, ou na medicina tradicional para o tratamento de distúrbios gastrointestinais, doenças respiratórias, febre, inflamações uterinas, corrimento vaginal ou como antisséptico para boca, garganta e feridas (Pascual et al., 2001; Oliveira et al., 2007, 2014).

Na Colômbia, *L. origanoides* é vulgarmente conhecida como "Orégano de monte" (orégano da montanha) (Vicuña et al., 2010). No México, *L. origanoides* é chamada de orégano, e a farmacopéia mexicana a reconhece como um substituto para o orégano comum (*L. graveolens* Kunth) (Oliveira et al., 2007).

A espécie apresenta porte arbustivo, podendo atingir aproximadamente 3 m de altura (Vicuña et al., 2010). Morfologicamente é caracterizada pela presença de folhas pecioladas, ovaladas e flores brancas, pequenas, reunidas em inflorescência racemosa axilar (Arango-Bedoya et al., 2012). É geralmente encontrada em ambientes secos, onde os solos são rasos, pedregosos e pobres em matéria orgânica (Albesiano et al., 2003; Suarez et al., 2008).

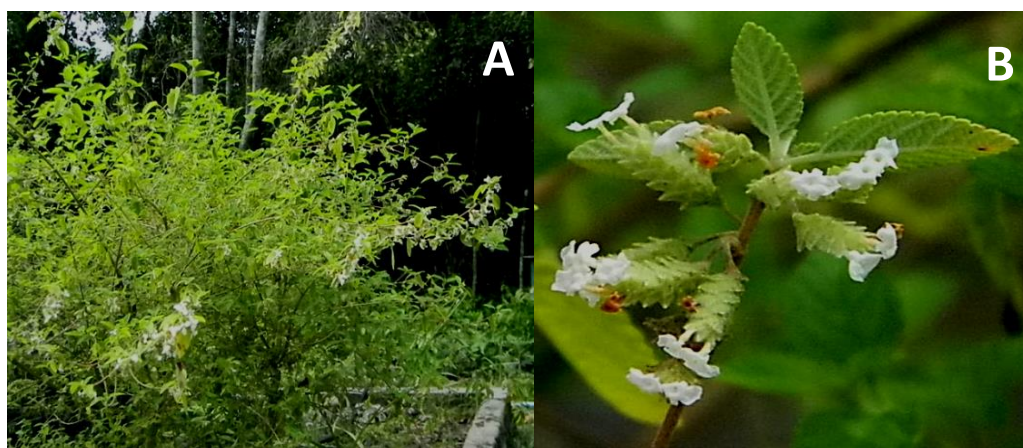


Figura 01 - A espécie *Lippia origanoides* Kunth (A). Detalhe da inflorescência (B).

O óleo essencial de *L. origanoides* é caracterizado pela presença de mono e sesquiterpenos, apresentando como constituintes majoritários os compostos: timol, carvacrol e *p*-cimeno. A concentração destes compostos define a presença de três variedades químicas distintas para a espécie (Stashenko et al., 2010; Vega-Vela et al., 2012). Os compostos (*E*)-metil cinamato e (*E*)-nerolidol também foram descritos como majoritários para esta espécie (Ribeiro et al., 2014).

Tanto extratos orgânicos quanto o óleo essencial obtidos de *L. origanoides* apresentam uso potencial com aplicações variáveis entre diferentes setores da indústria de alimentos, cosméticos, agrícola e farmacêutica, além de sua utilização como fonte de produtos fitoterápicos (Stashenko et al., 2010; Vicuña et al., 2010).

Estudos prévios relatam o potencial acaricida do extrato etanólico de *L. origanoides* contra *Tetranychus cinnabarinus* (Sivira et al., 2011) e atividade repelente do óleo essencial contra *Tribolium castaneum* e *Sitophilus zeamais* (Olivero-Verbel et al., 2009; Nerio et al., 2009; Caballero-Gallardo et al., 2012). Adicionalmente, a espécie apresenta efeito inibitório frente à *Tripanossoma cruzi* e *Leishmania chagasi* (Escobar et al., 2010; Borges et al., 2012), efeito antiviral sobre os vírus da dengue e febre amarela (Menezes et al., 2009), moderado efeito inibitório sobre *Mycobacterium tuberculosis* (Bueno-Sánchez et al., 2009), atividade antígenotóxica contra danos ao DNA induzidos por bleomicina (Vicuña et al., 2010), forte atividade antioxidante (Acevedo et al., 2007) e potencial antimicrobiano contra diferentes bactérias e fungos patogênicos (Oliveira et al., 2007; Tangarife-Castaño et al., 2011; Betancur-Galvis et al., 2011; Pinto et al., 2013; Sarrazin et al., 2015).

2.5 Potencial antimicrobiano de óleos essenciais

Os OE são reconhecidos por seu potencial antimicrobiano bem documentado (Burt, 2004; Silva et al., 2010a). Estas substâncias apresentam amplo espectro de ação sobre microorganismos, incluindo bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos responsáveis por um elevado número de infecções oportunistas (Sullivan et al., 2004; Farias et al., 2012; Bassolé e Juliani, 2012).

Dependendo da concentração, a ação dos OE contra microorganismos pode variar entre a inibição do crescimento (potencial bacteriostático ou fungistático) e a completa inibição do número de células viáveis (potencial bactericida ou fungicida). A ação bacteriostática ou fungistática tem caráter reversível uma vez que, determinado tempo após neutralização, células microbianas podem recuperar sua capacidade reprodutiva. Em contraste, o potencial bactericida ou fungicida tem um efeito permanente, impossibilitando o

crescimento ou reprodução celular (Pankey e Sabath 2004). Este potencial depende diretamente da composição química dos OE e geralmente são atribuídas à presença dos compostos fenólicos carvacrol, timol e eugenol (Lambert et al., 2001). Os mecanismos de ação antibacteriana destes compostos têm sido objeto de várias investigações *in vitro* (Juven et al., 1994; Lambert et al., 2001; Nostro et al., 2004) e *in vivo* (Adam et al., 1998; Manohar et al., 2001) e a maioria dos estudos apontam seus efeitos sobre estrutura e função de membranas celulares (Cox et al., 2000; Lambert et al., 2001). Devi e colaboradores (2010), por exemplo, avaliaram o potencial antibacteriano do eugenol contra *Salmonella typhi*, e concluíram que este composto atua sobre a membrana celular, promovendo ruptura e consequente extravazamento do conteúdo citoplasmático. Carvacrol e timol podem também interferir no transporte de elétrons, captação de nutrientes, síntese de proteínas e ácidos nucleicos e atividades enzimáticas (Sikkema et al., 1995; Burt et al., 2007; Turgis et al., 2009).

Por outro lado a atividade antifúngica dos OE tem sido atribuída ao aumento da permeabilidade iônica da membrana celular, inibição da formação de tubo germinativo ou alterações na biossíntese do ergosterol (Khan et al., 2010; Silva et al., 2011; Freires et al., 2014). Além disso, a indução de estresse oxidativo, caracterizado pelo excesso de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), é também considerada um possível mecanismo de morte fúngica celular. Este efeito foi confirmado após a exposição de *Candida albicans* a concentrações sub-letais de timol e carvacrol (Khan et al., 2015).

Segundo Silva et al. (2010c), a eficácia da atividade antimicrobiana de timol e carvacrol pode variar em função de seus teores presentes em OE. Entretanto, alguns autores sugerem que a atividade antimicrobiana dos OE é atribuída não somente a presença de compostos fenólicos, pois a presença de outros componentes presentes em baixas concentrações resulta em efeito sinérgico, aditivo ou mesmo interações antagônicas (Mourey e Canillac, 2002; Chorianopoulos et al., 2004; Bassolé e Juliani, 2012; Perricone, 2015). Há evidências, por exemplo, de que componentes presentes em menor quantidade que os compostos fenólicos, como γ -terpineno e p -cimeno, interferem na atividade antimicrobiana por produzirem efeito sinérgico entre os demais componentes (Silva et al., 2010a).

O uso combinado entre dois ou mais OE também confere uma estratégia ao desenvolvimento de agentes antimicrobianos eficazes. A combinação dos OE de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e cravo (*Syzygium aromaticum*), por exemplo, produziu um efeito aditivo contra bactérias *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* e *Pseudomonas aeruginosa*. O efeito sinérgico desta combinação foi observado quando a mistura foi aplicada contra *Candida albicans*, por outro

lado, contra *Aspergillus niger* um efeito antagônico foi observado (Fu et al., 2007).

Em baixas concentrações, os OE também podem agir como quimiossensibilizantes antifúngicos, conferindo uma nova estratégia na qual a co-aplicação destes compostos, quando em conjunto com uma droga antifúngica convencional, pode conferir uma nova estratégia de combate à microorganismos. Assim, podem reduzir significativamente a concentração de drogas requerida na terapia antifúngica, minimizar a toxicidade e ao mesmo tempo prevenir a emergência de cepas mutantes resistentes devido à presença de diferentes compostos químicos que podem atuar através de diferentes mecanismos de ação. (Daferera et al., 2003; Faria et al., 2011; Dzhavakhiya, et al., 2012; Campbell et al., 2012; Doke et al., 2014).

O potencial antimicrobiano de OE e seus componentes vêm sendo explorado comercialmente de maneira diversificada, não só pela indústria farmacêutica, como também pela indústria cosmética e higiene pessoal e indústria de alimentos (Lubbe e Verpoorte, 2011; Morales-Soto et al., 2015), Nesta última, os OE atuam na preservação de alimentos, impedindo o processo de deterioração promovido por microorganismos potencialmente patogênicos (Almeida et al., 2008).

2.6. Deterioração de alimentos por microorganismos potencialmente patogênicos

A deterioração de alimentos provocada por microorganismos tem sido um problema constante para a indústria alimentícia, bem como para entidades de vigilância em saúde, uma vez que, além da perda de alimentos e diminuição da produtividade, a ingestão de alimentos contaminados por microorganismos potencialmente patogênicos promove sérios danos à saúde humana (White et al., 2002; Almeida et al., 2008).

Para tentar minimizar o processo de deterioração de alimentos por microorganismos, a indústria alimentícia dispõe de diferentes alternativas que podem ser empregadas isoladas ou de maneira combinada. A tecnologia de barreiras múltiplas, definida como a aplicação de medidas combinadas de conservação, tem por finalidade aumentar a estabilidade microbiológica e a qualidade sensorial de alimentos, bem como suas propriedades nutricionais e econômicas (Leistner e Gorris, 1995). As principais barreiras utilizadas para a conservação de produtos alimentícios são: acidez (pH), temperatura, conservantes químicos, antibióticos ou microorganismos competidores, como bactérias ácido lácticas (BAL). Porém, estes mecanismos são ineficientes em situações específicas. Em alimentos refrigerados, por exemplo, pequenas mudanças de temperatura durante o transporte

e distribuição de alimentos, podem acarretar na multiplicação de microorganismos (De Martinis e Franco, 1997; Leistner, 1995, 2000).

Salmonella typhimurium, *S. enteridis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* e *B. subtilis* são exemplos de microorganismos frequentemente envolvidos tanto no processo de deterioração quanto na ocorrência de doenças veiculadas por alimentos. *Salmonella* spp., bactéria Gram-negativa pertencente a família Enterobacteriaceae, são responsáveis por graves intoxicações alimentares, sendo um dos principais agentes envolvidos em surtos registrados em vários países (Shinohara et al., 2008; Dunkley et al., 2009). Torna-se fator preocupante quando este microorganismo afeta pessoas com sistema imunológico debilitado, onde a infecção, se não tratada adequadamente, é rapidamente espalhada para diferentes sistemas do corpo (Bajpai et al., 2012).

Espécies pertencentes ao gênero *Salmonella* são comuns no intestino de répteis, aves e mamíferos, e são transmitidas a seres humanos através de diferentes alimentos de origem animal (Centers for Disease Control and Prevention - CDC, 2010). *Salmonella enteritidis* e *S. typhimurium* são as espécies responsáveis pela maioria das infecções em diversos países (Dunkley et al., 2009).

Não muito obstante dos dados relacionados à incidência de *Salmonella* no mundo, *Bacillus cereus* também é responsável por doenças de origem bacteriana de grande impacto na saúde pública. São bacilos Gram-positivos, formadoras de esporos, frequentemente envolvidos em dois tipos de doenças gastrointestinais transmitidas por alimentos: a emética e síndrome diarréica (Decousser et al., 2013; Sudhaus et al., 2014). O tipo emético é caracterizado por vômitos após um curto período de incubação (de 1 a 6 h), e é devido à cereulide, um péptido pré-formado no alimento. O tipo diarreico é caracterizado por cólicas abdominais e diarreia que ocorre dentro de 8 a 16 h após a ingestão de alimentos contaminados (Cadot et al., 2010).

A contaminação de superfícies com esporos de *B. cereus* é um grave problema para a indústria de laticínios, restaurantes, hospitais e até mesmo em casas particulares (Yibar et al., 2012; Sudhaus et al., 2014). Sua capacidade de esporulação e formação de biofilmes permite que as bactérias resistam a procedimentos de limpeza habitualmente utilizados (Cadot et al., 2010). Outras espécies de *Bacillus* foram associadas a doenças de origem alimentar. *Bacillus subtilis*, por exemplo, pode produzir lipopeptídeos cíclicos que mostram atividade tóxica, embora a sua ligação com doenças de origem alimentar permaneça incerta (Sudhaus et al., 2014).

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria Gram-negativa que possui intensa atividade metabólica com consequente degradação de proteínas, carboidratos, gorduras e

outros substratos. Representam o grupo de microorganismos mais frequente em alimentos frescos, tanto de origem vegetal quanto animal. Quando em níveis elevados no final do processamento, resultam na redução da vida de prateleira de produtos refrigerados, devido à produção do muco superficial, além de odores e sabores desagradáveis, sendo, portanto, seu estudo de grande importância para a indústria de alimentos (Maia et al., 2009).

O uso de drogas antimicrobianas como barreiras adicionais, tem suportado o controle de patógenos deteriorantes ou doenças de origem alimentar. Entretanto, a resistência conferida a esses agentes antimicrobianos tem levado à busca por novas alternativas no controle de microorganismos (Bajpai et al., 2012).

2.6.1 Mecanismos de resistência microbiana

A resistência microbiana é definida como a capacidade temporária ou permanente do microrganismo e sua descendência para permanecerem viáveis e/ou multiplicarem sob condições que poderiam destruir ou inibir outros membros da estirpe. Assim, um microrganismo pode ser definido como resistente quando não é suscetível a uma determinada concentração de agentes antimicrobianos rotineiramente utilizados (Cloete, 2003).

Os mecanismos de resistência podem ser classificados como intrínsecos ou adquiridos. Quando a resistência é natural, o microrganismo possui determinada estrutura que lhe confere resistência aquele antimicrobiano. Nesse caso, todas as cepas de espécies bacterianas são igualmente resistentes a todos os membros das classes antibacterianas (Tenover, 2006). A resistência natural é resultante da ação de genes cromossômicos que codificam estruturas ou mecanismos que impedem o antibiótico de agir em seu receptor ou que codificam a falta de sítio de ação da droga ou que determinam a existência de receptores inadequados para a ligação com uma substância específica (Berger-Bächli, 2002; Mota et al., 2005).

Além da resistência natural, aparentemente algumas espécies de microorganismos apresentam a habilidade genética para adquirir e transmitir resistência contra diferentes classes de antimicrobianos (Silva et al., 2010a). De acordo com Tenover (2006), a resistência a um determinado antimicrobiano pode ser adquirida por diversas maneiras. Os principais mecanismos de resistência a antibióticos são:

- Redução da permeabilidade da membrana;
- Alterações na via metabólica, anteriormente bloqueada pelo agente antimicrobiano;
- Remoção ativa de antibióticos de dentro da célula;

- Produção de enzimas que degradam medicamentos, tornando-os inativos;
- Modificação do sítio alvo do antibiótico.

Ao utilizar um dos mecanismos descritos acima, ou uma combinação destes, cepas de microorganismos vêm sobrepujando até antibióticos mais promissores, independente da classe química as quais pertençam (Silveira et al., 2006). Assim, além do controle de uso inadequado de antibióticos, faz-se necessária a busca por novas fontes naturais com propriedades antimicrobianas clinicamente eficazes e comprovadamente seguras.

2.7. Infecções causadas por espécies do gênero *Candida*

Os fungos são organismos comuns no meio ambiente, incluindo ar, solo e água ou podem ainda colonizar outros organismos como plantas e animais. A maioria das espécies não confere perigo ao hospedeiro, sendo consideradas espécies da flora comensal. Não obstante, algumas espécies podem tornar-se patogênicas em decorrência de alterações no sistema imunológico do hospedeiro (Martins et al., 2015).

Por serem organismos eucarióticos, infecções promovidas por fungos apresentam maiores dificuldades terapêuticas quando comparado a infecções bacterianas. Apesar dos avanços terapêuticos decorrentes do aumento no número de antifúngicos comercialmente disponíveis, a resistência aos antifúngicos ainda representa um grande desafio para a clínica médica (Kanafani e Perfect, 2008). Em particular, espécies pertencentes ao gênero *Candida* são inerentemente resistentes ou rapidamente adquirem resistência a drogas antifúngicas (Ahmad et al., 2011). Este gênero é composto por aproximadamente 200 diferentes espécies de leveduras consideradas patógenos oportunistas, pois podem facilmente colonizar o corpo humano, sem levar ao surgimento de infecções em condições fisiológicas normais (Álvares et al., 2007). Porém, quando ocorre comprometimento do sistema imunológico, espécies do gênero *Candida* podem ser responsáveis por um alto número de casos de infecções fúngicas oportunistas, variando de infecções superficiais (mucosas ou cutâneas) a infecções viscerais invasivas (Sullivan et al., 2004; Farias et al., 2012).

Nas últimas duas décadas, o número de infecções fúngicas causadas por leveduras do gênero *Candida* aumentou significativamente, principalmente devido ao aumento do número de pacientes imunocomprometidos, tais como indivíduos infectados pelo HIV, transplantados e pacientes com câncer (Martins et al., 2015). Estes pacientes são particularmente vulneráveis e podem morrer devido a infecções fúngicas oportunistas (Binder e Lass-Flörl, 2011).

Entre as espécies que compõem esse gênero, *Candida albicans* apresenta maior relevância em função de sua taxa de prevalência em condições de normalidade e de doença. Porém, outras espécies como *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* são também frequentemente isoladas de sítios de infecções fúngicas humanas, e assim como *C. albicans*, são conhecidas por apresentar resistência antifúngica intrínseca ou adquirida (Perea e Patterson, 2002; Álvares et al., 2007).

O mecanismo de ação e o mecanismo de resistência antifúngica a drogas comerciais têm sido descritos em detalhe. Com exceção de drogas antifúngicas cujo mecanismo de ação envolve a inibição da síntese de DNA e proteínas, todos os demais antifúngicos atuam, de alguma forma, sobre a biossíntese do ergosterol, o principal esterol presente na composição da membrana celular de células fúngicas (White et al., 1998).

Alguns antifúngicos são também capazes de provocar danos oxidativos celulares. Estudos conduzidos por Liu e colaboradores (2005), por exemplo, confirmaram que anfotericina B-AmB, um antifúngico poliênico, não só apresentou efeito sobre a expressão de genes envolvidos na síntese do ergosterol, como também induziu a expressão de genes de resposta ao estresse oxidativo. Estes achados podem orientar novas estratégias para melhorar a eficácia de antibióticos já comercializados, bem como no desenvolvimento de novos compostos com ação antifúngica.

2.8. Estresse oxidativo e danos a biomoléculas

O processo de oxidação pode ser definido como sendo a conversão de uma substância química em um derivado com menor número de elétrons. Oxidação, portanto, é a perda de um ou mais elétrons para outra substância e o procedimento inverso pode ser considerado como redução. A transferência de elétrons, que ocorre durante o processo oxidativo, é um processo químico fundamental para a sobrevivência das células. Porém, o efeito colateral dessa dependência é a produção de radicais livres e outras espécies reativas, responsáveis por danos oxidativos (Alves et al., 2010).

Em geral, os radicais livres possuem meia-vida muito curta (mili, micro ou nanosegundos), reagindo rapidamente com diversos compostos e alvos celulares (Devasagayam, 2004). Estas moléculas são produzidas continuamente por meio de processos endógenos tais como: respiração mitocondrial, ativação de leucócitos polimorfonucleares, metabolismo do ácido araquidônico, funções enzimáticas, entre outros (Alves et al., 2010; Nunes et al., 2012).

Normalmente as moléculas danificadas são reparadas ou substituídas, porém, em

certas circunstâncias, um desequilíbrio significativo entre as espécies reativas e o sistema de defesa antioxidante pode ocorrer a favor das espécies reativas. A esse desequilíbrio dá-se o nome de estresse oxidativo (Halliwell, 2006; Willcox et al., 2004). Os danos oxidativos podem resultar não somente devido ao aumento na produção de espécies reativas, mas também de falhas no sistema de reparo de biomoléculas, acarretando na diminuição dos níveis de antioxidantes (Halliwell, 2006).

As principais espécies reativas produzidas são: espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs), estas incluem espécies radiculares e não-radicalares. Entre as EROs radiculares derivadas do oxigênio destacam-se o radical hidroxila (OH^\bullet), radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peroxila (ROO^\bullet) e alcoxila (RO^\bullet); entre os não radicalares estão inclusos o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HOCl) e o oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$).

Entre as ERNs destacam-se o óxido nítrico (NO) e o dióxido de nitrogênio (NO_2). O óxido nítrico é uma espécie radical derivada do nitrogênio que desempenha importantes funções no organismo humano. Pode reagir com as EROs, principalmente radical superóxido, gerando peroxinitrito (OONO^\bullet) e outros produtos extremamente tóxicos por causar nitração de proteínas e induzir a peroxidação lipídica (Ribeiro et al., 2005).

As principais fontes endógenas formadoras de EROs incluem as mitocôndrias e os peroxissomos (Schrader e Fahimi, 2006; Valko et al., 2006). No metabolismo celular aeróbio, a formação de EROs *in vivo* ocorre via ação catalítica de enzimas, que auxiliam o processo de transferência de elétrons. Assim, o oxigênio, após aceitação de quatro elétrons (redução tetravalente), resulta na formação de água (H_2O). Durante este processo são formados intermediários reativos como o radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), radical hidroxila (OH^\bullet), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e hidroperoxila (HO_2^\bullet) (Ferreira e Matsubara, 1997). Quanto ao potencial de reatividade das EROs em meio biológico, o radical hidroxila é considerado o mais reativo, podendo ocasionar sérios danos a qualquer biomolécula próxima ao sítio de origem (Dasgupta e Bratati, 2004).

Para proteger-se dos danos causados pelo estresse oxidativo, os organismos desenvolveram um sistema de defesa antioxidante que pode atuar em três níveis distintos:

(I) prevenção da formação de EROs: restrição de *spin* do oxigênio, diminuindo sua reatividade com biomoléculas; o transporte de oxigênio na forma ligada (não livre); quelação de metais por proteínas (albumina, mioglobina, ferritina) durante o transporte e armazenamento, evitando a ocorrência da reação de Fenton e, dessa forma, prevenindo a superprodução de OH^\bullet ,

(II) eliminação das EROs através de mecanismos enzimáticos e não enzimáticos. O

sistema antioxidante enzimático inclui a superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (Se-Gpx), glutatona redutase (Gr), Glutatona S-transferases (GST), catalase (CAT) (Michiels et al., 1994) tiorredoxina redutase (Txr) (Nordberg e Arnér, 2001). O sistema antioxidante não enzimático relaciona-se com um grupo de antioxidantes que podem ser congregados em compostos produzidos *in vivo*, como é o caso da glutatona (GSH), ubiquinona e do ácido úrico, e em compostos obtidos diretamente da dieta tais como o *α*-tocoferol (vitamina-E), *β*-caroteno (pro-vitamina-A) e ácido ascórbico (vitamina-C) (França et al., 2013);

(III) mecanismo de reparo; enzimas que reparam ou eliminam biomoléculas danificadas por espécies reativas. Três mecanismos básicos foram descritos para reparar danos oxidativos do DNA: reparo por excisão de bases - *BER*, reparo por excisão de nucleotídeos - *NER* e reparo de erros de pareamento de bases - *MMR* (Ribeiro et al., 2005; Giaginis et al., 2006; Nunes et al., 2012). Assim, por definição, antioxidantes são moléculas que inibem, diminuem ou retardam o processo de oxidação.

2.9. *Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo para análise de atividade antifúngica por estresse oxidativo.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* representa um dos melhores modelos de sistema eucariótico unicelular para estudos de atividade antifúngica por estresse oxidativo. Além da vantagem de ser um microrganismo unicelular de crescimento rápido, estas leveduras também representam vantagem de uso devido a seu completo sequenciamento genômico e à facilidade de obtenção de cepas mutantes com reconhecida sensibilidade a agentes indutores do estresse oxidativo (Jia et al., 2002; Brennan Schiestl, 1996).

Para manter o balanço redox, estas leveduras dispõem de um elaborado mecanismo de defesa enzimático, constituído por superóxido dismutases, redutases, catalases, peroxidoredoxinas, glutarredoxinas e glutatona transferases, e não-enzimático, envolvendo a participação da glutatona (γ -glutamil-L-cisteinil-glicina-GSH) (Herrero et al., 2008).

Em *S. Cerevisiae*, os genes GSH1 e GSH2 codificam a γ -glutamil-cisteinil-sintetase e a glutatona sintetase, respectivamente. Estes genes estão envolvidos na biossíntese da glutatona, cuja função é atuar no sequestro de radicais livres através da reação entre o grupo sulfidrilo redox-ativo e moléculas oxidantes (Sies, 1999; Gharieb et al., 2004; Adamis et al., 2007; Huber e Almeida, 2008). Esta reação resulta na formação da glutatona oxidada (GSSG) que pode ser regenerada pela glutatona redutase. Tem sido demonstrado que a exposição de células de levedura a agentes oxidantes, resulta no aumento nos níveis de GSH1 (Stephen e Jamieson, 1997). Mutantes deficientes em GSH1 e GSH2 são sensíveis a

compostos como o H_2O_2 e a metais pesados como, por exemplo, o cádmio (Cd^{2+}) (Suizu et al., 1994). Os principais efeitos nocivos da exposição de células ao Cd^{2+} são: (I) indução do estresse oxidativo, (II) interferência com as vias de sinalização intracelular e (III), interferência nos mecanismos de reparo do DNA (Beyersmann e Hartwig, 2008; Wysocki e Tamas, 2010). A exposição ao Cd^{2+} aumenta os níveis intracelulares de EROs, proteínas carboniladas, peroxidação lipídica, e erros no pareamento de bases (Stohs e Bagchi, 1995).

Em leveduras, o principal mecanismo de defesa contra o Cd^{2+} consiste na formação do complexo GSH-metal (Adamis et al., 2007). Uma vez conjugado à glutationa, o Cd^{2+} é transportado para dentro do vacúolo, o que limita concentrações citoplasmáticas deste metal. Esta compartimentação requer energia, e envolve a proteína YCF1, responsável pela mediação do acúmulo vacuolar do complexo cádmio-glutationa nesta organela (Gomes et al., 2002; Adamis et al., 2004). Mutantes $\Delta ycf1$, deficientes no sistema de transporte vacuolar do Cd^{2+} , conferem sensibilidade de células de levedura a esse metal (Wemmie et al., 1994). Assim, quando presentes em altas concentrações no espaço citoplasmático, o complexo formado entre Cádmio e GSH é prejudicial para a célula, provocando mutações (Adamis et al., 2007), e deixando a célula vulnerável ao estresse oxidativo, devido à reduzida disponibilidade intracelular de GSH (Almazan et al., 2000).

Além do GSH1, outros genes estão envolvidos na resposta ao estresse oxidativo. O gene RNR3, por exemplo, é responsável pela codificação da ribonucleotideo-redutase (RNR), uma enzima que catalisa a redução de ribonucleotideos a desoxirribonucleotideos necessários para a síntese de DNA (Elledge et al., 1992). Este gene é reconhecido por ser responsivo a danos ao DNA, incluindo danos oxidativos (Endo-Ichikawa et al., 1995, 1996).

As Peroxirredoxinas (Prx) são enzimas que atuam como antioxidantes redutores de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e hidroperóxidos (LOOH) à água ou o álcool correspondente, respectivamente (Bang et al., 2012). Em *S. cerevisiae*, as Prx1p estão localizadas nas mitocôndrias e sua expressão é aumentada quando as células utilizam a via respiratória, assim como em resposta a condições de estresse oxidativo (Pedrajas et al., 2000). O gene KAR2 codifica uma chaperona molecular denominada BiP, que pertencem a uma família de proteínas expressas no retículo endoplasmático (RE) de todas as células eucarióticas, incluindo células de leveduras (Haas, 1994; Simons et al., 1995). KAR2/BiP são importantes sensores de espécies reativas de oxigênio; podem mudar sua atividade quando estes produtos químicos prejudiciais estão presentes, e dessa forma, ajudam a proteger a célula contra danos oxidativos (Wang et al., 2014).

Assim, linhagens isogênicas, deficientes em defesas antioxidantes, têm sido utilizadas para o estudo do mecanismo de ação de agentes físicos e químicos que interferem

com o estado redox celular (Brennan e Schiestl, 1998; Lee et al., 2001). Dessa forma, a atividade quimiossensibilizante de compostos químicos (ex. óleos essenciais) pode ser avaliada através da análise da expressão de genes envolvidos na resposta ao estresse oxidativo. Além disso, *S. cerevisiae* está mais intimamente relacionado com *Candida albicans*, espécie considerada como um dos principais agentes fúngicos patogênicos oportunistas (Barns, et al., 1991; Hughes, 2002; Agarwal et al., 2003).

2.10. Oxidação lipídica em alimentos processados

Além de promoverem danos a biomoléculas, os radicais livres também são responsáveis por promover a oxidação de alimentos com determinado teor de gordura. Os produtos resultantes da oxidação lipídica são indesejáveis não somente pela redução de vida útil e alterações sensoriais; a oxidação lipídica pode promover a degradação de seus constituintes essenciais, tais como vitaminas lipossolúveis e ácidos graxos essenciais, ocasionando o decréscimo do valor nutricional de alimentos, além da formação de produtos potencialmente tóxicos para a saúde humana (Scherer e Godoy, 2009; Cansian et al., 2010; Roby et al., 2013).

Segundo Ramalho e Jorge (2006), os lipídios podem ser oxidados por diferentes caminhos: **Reações hidrolíticas** - catalisadas pelas enzimas lipase ou pela ação de calor e umidade, com formação de ácidos graxos livres; **Oxidação enzimática** – ocorre quando enzimas lipoxigenases atuam sobre os ácidos graxos poliinsaturados, catalisando a adição de oxigênio à cadeia hidrocarbonada poliinsaturada, resultando na formação de peróxidos e hidroperóxidos com duplas ligações conjugadas que podem envolver-se em diferentes reações degradativas; **Fotooxidação** – promovida pela radiação UV em presença de fotossensibilizadores como clorofila, mioglobina, riboflavina e outros, que absorvem a energia luminosa de comprimento de onda na faixa do visível e a transferem para o oxigênio tripleto ($^3\text{O}_2$), gerando o estado singleto ($^1\text{O}_2$). O oxigênio singleto formado reage diretamente com as duplas ligações, formando hidroperóxidos diferentes dos que se observam na ausência de luz e de sensibilizadores, e que por degradação posterior originam aldeídos, álcoois e hidrocarbonetos; **Autooxidação** - principal mecanismo de oxidação de óleos e gorduras. Está associada à reação do oxigênio com ácidos graxos insaturados.

A autooxidação lipídica ocorre em três etapas: iniciação, propagação e terminação. A reação inicia-se com a retirada de uma molécula de hidrogênio do ácido graxo que contém dupla ligação, com conseqüente formação do radical lipídico (L^{\bullet}), o que caracteriza a etapa de iniciação. O radical lipídico (L^{\bullet}) reage então com o oxigênio molecular formando o radical

peroxila (LOO^{*}), e este fica propenso a retirar átomos de H de outro ácido graxo poliinsaturado, caracterizando a reação em cadeia da etapa de propagação. A combinação do radical peroxila com o H^{*} abstraído, resulta na formação de hidroperóxidos lipídicos (LOOH). A etapa de terminação instala-se com a neutralização dos radicais formados por ação de antioxidantes lipossolúveis, como por exemplo α -tocoferol e α -caroteno (Sies e Stahl, 1995).

As reações em cadeia resultam na formação de produtos secundários, como os aldeídos. O malonaldeído (MDA - aldeído insaturado), por exemplo, derivado da β -ruptura de endociclicização de ácidos graxos polinsaturados, tais como ácido linoléico, araquidônico e docosahexaenóico, tem a capacidade de se ligar covalentemente a grupos nucleofílicos presentes no DNA, peptídeos e proteínas, causando modificações funcionais a estas moléculas, o que pode resultar em diferentes processos degenerativos. Por esse motivo o MDA é frequentemente utilizado como marcador bioquímico da peroxidação de lipídeos em sistemas *in vivo* e *in vitro* (Halliwell e Chirico, 1993; França et al., 2013). Os produtos de quebra, gerados durante o processo de oxidação lipídica são considerados potencialmente tóxicos às células, e podem alterar proteínas e desencadear respostas imunológicas (Witztum, 1994; Ribeiro et al., 2005).

Compostos capazes de interferir na reação em cadeia são chamados antioxidantes diretos e são divididos em dois principais grupos: antioxidantes preventivos, que interferem na etapa de iniciação do processo radicalar (como algumas enzimas inclusive a peroxidase e a catalase) e antioxidantes de quebra de cadeia, que interferem na etapa de propagação radicalar (como fenóis e aminas aromáticas), reagindo com radicais peroxila mais rapidamente do que o substrato oxidável, e dessa forma formando espécies que não se propagam a cadeia de oxidação (Cardoso, 1997; Amorati et al., 2013).

2.11. Potencial antioxidante de óleos essenciais em produtos alimentícios

Para reduzir os riscos com o processo de oxidação, a indústria de alimentos utiliza conservantes químicos sintéticos - tais como butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), terc-butil-hidroxi-quinona (TBHP) e galato de propila (GP) - como um método convencional para melhorar a segurança alimentar. Entretanto, estes produtos são relatados por produzir efeitos negativos sobre a saúde humana, podendo exibir propriedades carcinogênicas e toxicidade hepática em organismos vivos (Turkoglu et al., 2007; Oke et al., 2009; Scherer e Godoy, 2009; Zhao et al., 2010; Guleria et al., 2013, Roby et al., 2013).

A crescente tendência mundial do mercado consumidor pela aquisição de produtos diferenciados, com alto valor nutricional, isentos ou com o mínimo possível de

aditivos químicos, tem conduzido a indústria de alimentos a buscar compostos alternativos para alcançar suas metas relacionadas ao controle do processo de degradação por oxidação.

A busca por antioxidantes naturais tem dado origem a um grande número de estudos sobre o potencial antioxidante de OE e/ou seus componentes isolados. Em particular, a capacidade antioxidante de componentes fenólicos tem sido avaliada com o objetivo de uso destes compostos naturais como aditivos em alimentos (Burt, 2004). Segundo Amorati e colaboradores (2013), um bom comportamento antioxidante pode ser esperado de um OE com elevado conteúdo de compostos fenólicos e modesto conteúdo em terpenos insaturado; proteção ainda maior pode ser promovida por óleos ricos em compostos fenólicos e boas quantidades de componentes ciclohexadieno (ex, γ -terpineno). Ainda segundo os autores, OE que apresentam modesto ou nenhum conteúdo em compostos fenólicos ou nenhum conteúdo de componentes ciclohexadieno são susceptíveis de oferecer modesta ou nenhuma proteção antioxidante quando misturados com gorduras comestíveis.

A seleção de antioxidantes para a indústria de alimentos, leva em consideração aspectos como: eficiência em baixas concentrações (0,001% a 0,01%), ausência de interferências indesejáveis nos parâmetros sensoriais característicos dos alimentos, como cor, odor e sabor, compatibilidade com a matriz alimentar, facilidade de aplicação, segurança de ingestão do composto e seus produtos de oxidação, mesmo que sejam ingeridos em doses maiores do que as geralmente ingeridas nos alimentos, bem como sua estabilidade nas condições de processo e armazenamento (Ramalho e Jorge 2006).

2.12. A tecnologia de microencapsulação como alternativa para retenção de voláteis bioativos presentes em óleos essenciais

Os OE são ingredientes valiosos para a indústria têxtil, produtos de perfumaria, cosméticos, agrícola, farmacêutica e de alimentos (Xial et al., 2014). Nesta última, os OE têm sido estudados como agentes antimicrobianos no combate a bactérias contaminantes de alimentos, bem como na proteção contra o processo de oxidação (Arora et al., 1999). Porém estes óleos são compostos por substâncias voláteis, e grande parte de seus constituintes podem sofrer degradação quando expostos a altas temperaturas, oxidação e/ou radiações UV. Assim, a extensão desses efeitos pode ser suficiente para alterar a qualidade dos produtos finais, limitando seu uso em aplicações comerciais (Baranauskien et al., 2006; Chung et al., 2013; López et al., 2014).

A fim de melhorar a estabilidade de OE, alguns métodos foram introduzidos. A tecnologia de microencapsulação, por exemplo, é um dos processos mais eficientes para

minimizar danos a estes compostos, aumentando a estabilidade química e consequente eficiência biológica, além de facilitar o transporte e manuseio destes compostos devido ao processo de solidificação (Liolios et al., 2009; Varona et al., 2010; Teodoro et al., 2014, Xiao et al., 2014).

O processo de microencapsulação consiste no empacotamento de substâncias sólidas, líquidas ou materiais gasosos, por finas membranas de polímeros naturais ou sintéticos, formando partículas com dimensões microscópicas, as quais podem liberar seus conteúdos em quantidades controladas e em condições específicas (Fang et al., 2010). O material encapsulado é denominado núcleo, e o revestimento externo é denominado material de parede. As microcápsulas são então preparadas a partir da emulsificação do material que compõe o núcleo, com uma solução densa de material de parede. A posterior secagem da emulsão as transforma em um pó mais estável, que pode apresentar tamanho variado (entre 0,2 e 500 μm) e diferentes formas, dependendo dos materiais e métodos usados para prepará-las (Pulido e Beristáin, 2010; Tonon, et al., 2011 Tarun et al., 2011).

A escolha dos materiais de parede deve levar em consideração suas propriedades emulsificantes e a capacidade de atingir alto teor de sólidos e viscosidade necessária para formar uma rede de gel capaz de proteger o núcleo (Augustin e Hemar, 2009). Outros fatores que devem ser analisados são: reatividade com o material a ser encapsulado, aplicações do produto, natureza do material a ser encapsulado, o processo de encapsulação, fatores econômicos e aprovação pelos órgãos que regulamentam a utilização de qualquer ingrediente em sistemas alimentícios (Amrita et al., 1999). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é o órgão responsável por essa regulamentação.

De acordo com Jefari e colaboradores (2008), do ponto de vista técnico, a escolha do material de parede é considerada uma etapa crítica, uma vez que estes materiais influenciam nas propriedades da emulsão antes da secagem, retenção dos compostos voláteis durante a secagem e vida útil das microcápsulas após a secagem.

Materiais de parede, tais como: gomas (goma arábica, alginato de sódio, carragena); carboidratos (dextrinas, amidos e sacarose); lipídios (óleos, gordura hidrogenada, triesterina, parafina, cera, ácido esteárico, monoglicerídeo e diglicerídeos); celuloses (metilcelulose, acetilcelulose, carboximetilcelulose, etilcelulose e nitrocelulose); proteínas (caseína, albumina, glúten, isolado protéico de soro de leite e gelatina), além da quitosana, extraída da casca de crustáceo, são tipicamente utilizados em tecnologias de microencapsulação (Favaro-Trindade et al., 2008, Servat et al., 2010).

Misturas entre diferentes agentes encapsulantes tem sido utilizadas com o objetivo de aumentar a efetividade da microencapsulação. Os materiais de parede mais utilizados no

processo de microencapsulação de aditivos alimentares são a goma arábica (GA) e a maltodextrina (MA). GA é um polissacarídeo natural derivado de exsudatos extraídos de *Acacia senegal* e *A. seyal*, constituída principalmente por arabinose (24-27%), galactose (39-42%), raminose (12-16%), ácido-glucurônico (15-16%) e uma fração glicoprotéica de baixo peso molecular (5-10%), responsável pela propriedade emulsificante da goma (Ali et al., 2009). É considerada um agente eficaz em processos de encapsulação de agentes lipofílicos, uma vez que possui alta solubilidade e baixa viscosidade em soluções aquosas, comparada a outras gomas hidrocolóides. Produz emulsões estáveis com a maioria dos óleos em uma ampla faixa de pH (Tonon et al., 2011; Xial et al., 2014), porém, apresenta como desvantagens o custo elevado, a baixa disponibilidade e qualidade variável (Krishnan et al., 2005).

A maltodextrina, um amido hidrolizável com diferentes graus de equivalente dextrose (DE), não apresenta propriedades emulsificantes, e por isso deve ser utilizada juntamente com outros materiais que possuem essa propriedade (Gharsallaoui et al., 2007; Madene et al., 2006). Por outro lado, apresenta alta solubilidade em água (75%), baixa viscosidade e alto teor de sólidos, proporcionando integridade estrutural ao produto final. Sua incorporação em formulações, em substituição de açúcares simples, reduz a pegajosidade durante a secagem, um efeito decorrente de sua temperatura de transição vítrea mais elevada (Turchiuli et al., 2005; Augustin e Hemar, 2009).

Os principais fatores que afetam a eficiência da encapsulação de óleos são: o tipo de material de parede, as propriedades dos materiais do núcleo (concentração, volatilidade), as características da emulsão (total de sólidos, viscosidade, tamanho de gotas) e as condições do processo de secagem (temperatura do ar de entrada, fluxo de ar, umidade) (Jafari et al., 2008).

Compostos microencapsulados podem ser obtidos por métodos físicos como: *spray drying*, *spray cooling*, pulverização em banho térmico, secagem em leito fluidizado, extrusão centrífuga com múltiplos orifícios, co-cristalização e liofilização; métodos químicos tais como: inclusão molecular e polimerização interfacial; ou ainda métodos físico-químicos como: coacervação ou separação de fases, emulsificação seguida de evaporação do solvente, pulverização em agente formador de reticulação e envolvimento lipossômico (Gharsallaoui et al., 2007; Augustin e Hemar, 2009).

A escolha do método de microencapsulação depende das propriedades do material a ser encapsulado (especialmente a solubilidade) e da finalidade do produto (proteção e modificações na liberação) (Servat et al., 2010). De acordo com o processo de microencapsulação utilizado, as matrizes podem apresentar formatos diferentes (filmes, esferas, partículas irregulares), diferentes estruturas (porosas ou compactas) que irão

influenciar a difusão dos compostos encapsulados no meio (Madene et al., 2006).

A microencapsulação por *Spray drying* (atomização) destaca-se por ser um processo bem estabelecido em muitos setores das indústrias de fitoterápicos e alimentos (Couto et al., 2013). Nesta técnica, a proteção dos componentes voláteis ocorre devido ao curto tempo de exposição do núcleo ao ar quente contido em uma câmara de secagem, associado à rápida evaporação da água presente na emulsão, o que mantém a temperatura do núcleo sempre baixa, evitando sua degradação e volatilização (Gharsallaoui et al., 2007).

A retenção de voláteis dentro de uma microcápsula e a sua estabilidade dependem de fatores tais como: condições do processo de microencapsulação, propriedades do material de parede, natureza química do núcleo, incluindo peso molecular, funcionalidade química, polaridade e volatilidade relativa, bem como de sua localização dentro da estrutura da microcápsula até a liberação desencadeada por estímulos externos (Madene et al., 2006; Augustin and Hemar, 2009). Segundo Gouin (2004), a liberação controlada do ingrediente encapsulado no lugar certo e no tempo certo pode assegurar a dosagem adequada, melhorar a eficácia, ampliando, dessa forma, sua escala de aplicação.

Na indústria de alimentos, o processo de microencapsulação protege o material que compõe o núcleo de fatores ambientais externos, bem como de outros componentes presentes na matriz alimentar, tornando o processo de encapsulação capaz de melhorar o valor nutricional, sem afetar o sabor, o aroma ou a textura dos alimentos, e ainda aumentar a vida de prateleira e a estabilidade do ingrediente ativo presente no produto final. Este processo pode ainda modificar a cor, a forma, o volume ou a fotossensibilidade da substância encapsulada e mascarar odor e/ou sabor desagradável de princípios ativos (Augustin e Hemar, 2009). Outras aplicações incluem repelentes de inseto, tinturas, vitaminas, agentes antimicrobianos e aplicações farmacêuticas, tais como antibióticos, hormônios e outras drogas (Nelson, 2002).

2.13. Óleos essenciais e seus efeitos tóxicos ao organismo humano

Embora os OE possam ser utilizados em diferentes setores industriais, uma vez constituídos por uma complexa mistura de substâncias químicas, é importante ressaltar que alguns de seus constituintes podem apresentar certo grau de toxicidade ao organismo. Assim, os efeitos fisiológicos e tóxicos ao organismo humano necessitam de maiores investigações.

Segundo Al-Reza et al, (2010), quando utilizados de maneira inapropriada, os OE podem promover efeitos adversos ao homem como irritação da pele, dor de cabeça e náuseas. Outros efeitos tóxicos dos OE incluem dor epigástrica, diarreia, convulsões e insuficiência

renal (Riordan et al., 2002). Porém, a toxicidade de OE, bem como de seus compostos isolados, depende da dose administrada, sendo muitas vezes produzidas reações tóxicas apenas em doses elevadas (Cleff et al., 2008). Fletcher e colaboradores, (2005), por exemplo, analisaram o potencial mutagênico do OE de *Melaleuca angustifolia*, e concluíram que seu potencial tóxico apresenta-se somente em doses acima de 1500 µg kg⁻¹.

O óleo essencial obtido do orégano pode promover reações alérgicas, sendo recomendado evitar o consumo excessivo durante a gravidez devido a suas propriedades sedativas e abortivas (Arcila-Lozano, 2004). Em estudos envolvendo α -terpineno, foi verificado a embriofetotoxicidade dose-dependente em modelo de ratos, levando à má formação do esqueleto destes animais (Araújo et al., 1996). O OE de *Artemisia afra* produziu nefrite hemorrágica, mudanças degenerativas no fígado e edema pulmonar, após administração oral em modelo animal (Mukinda et al., 2007). Sabineno, sabinol e acetato de sabinil são os metabólitos responsáveis pela toxicidade de *Juniperus sabina*, espécie incluída na Base de Plantas Tóxicas do FDA (*Food and Drug administration*). Esta espécie possui efeito irritante sobre o trato intestinal, promove insuficiência renal, menorragia e aborto (Radulović et al., 2015).

2.14. A influência sazonal sobre a composição química e potencial biotecnológico de espécies vegetais

Os OE essenciais compreendem uma classe de produtos relacionados ao desenvolvimento fisiológico de espécies vegetais. Eles representam uma interface química entre plantas e meio ambiente e, dessa forma, sua biosíntese é facilmente afetada por condições ambientais (Castelo et al., 2012). Além de fatores genéticos e condições de nutrientes de solo, variações sazonais que ocorrem no curso de um ano, caracterizam-se com um dos fatores que podem influenciar significativamente as características químicas quantitativas e/ou qualitativas de OE (Brant et al., 2008). Fatores climáticos como fotoperíodo, temperatura, umidade, precipitação e intensidade de radiação solar, podem determinar a época ideal de colheita ou o local de cultivo, onde poderá se obter maior quantidade de OE e do princípio ativo desejado (Paulus et al., 2013).

Os efeitos das variações sazonais sobre as características químicas e biológicas de alguns OE da família Verbenaceae foram relatados na literatura. Em *Lippia alba* (quimiotipo citral-limoneno), por exemplo, o horário de colheita, tanto na estação seca quanto na chuvosa, resultou em maior teor de OE e de citral (Nagao et al., 2004). A influência da sazonalidade sobre o rendimento e composição química do OE de *L. origanoides* foi verificada por Sarrazin

et al. (2015). Neste estudo, os autores concluíram que a variação sazonal ocorrida durante os 12 meses de coleta não alterou o rendimento médio em OE, e teve pouca influência sobre sua composição química. Porém, quando comparado o OE de espécimes de *L. origanoides* coletados em diferentes regiões, observam-se significativas variações químicas quantitativas e qualitativas.

Assim, dados obtidos de estudos sazonais, correlacionando a composição química de OE e fatores ambientais, tornam-se importantes para a padronização de tecnologias agronômicas que objetivam otimizar a produção de espécies com potencial biotecnológico para diferentes setores industriais, priorizando a preservação dos princípios ativos de espécies cultivadas.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Avaliar a composição química, potencial antimicrobiano e antioxidante do óleo essencial de *Lippia origanoides* Kunth.

3.2. Específicos

1. Avaliar a capacidade antioxidante e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Lippia origanoides* contra microorganismos contaminantes de alimentos - CAPÍTULO II
2. Determinar a suscetibilidade de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* frente ao OE de *L. origanoides*, e analisar o efeito quimiosensibilizante de concentrações sub-inibitórias deste OE, explorando respostas ao estresse oxidativo e mutagênico, utilizando a levedura *S. cerevisiae* como modelo experimental- CAPÍTULO III
3. Avaliar a influência de variações sazonais sobre o rendimento, composição química e potencial antimicrobiano do óleo essencial de *Lippia origanoides* - CAPÍTULO IV
4. Conhecer os efeitos do processo de microencapsulação do OE de *L. origanoides* sobre a retenção de seus compostos aromáticos com potencial bioativo - CAPÍTULO V

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abad, M.J.; Sanchez, S.; Bermejo, P.; Villar, A.; Carrasco, L. Antiviral activity of some South American medicinal plants. **Phytotherapy Research**, 13: 142-146, 1999.
2. Abena, A. A.; Diatewa, M.; Gakosso, G.; Gbeassor, M.; Hondi-Assaha, H.; Ouamba, J. M. Analgesic, antipyretic and anti-inflammatory effects of essential oil of *Lippia multiflora*. **Fitoterapia**, 74: 231-236, 2003.
3. Acevedo, A.M.; Castañeda, M.L.; Blanco, K.M.; Cardenas, C.Y.; Reyes, J.A.; Kouznetsov, V.V.; Stashenko, E.E. Composición y capacidad antioxidante de especies aromáticas y medicinales con alto contenido de timol y carvacrol. **Scientia et Technica**, 33: 125-128, 2007.
4. Adam, K.; Sivropoulou, A.; Kokkini, S.; Lanaras, T.; Arsenakis, M. Antifungal Activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, 46: 1739-1745, 1998.
5. Adam, K.-P.; Zapp, J. Biosynthesis of the isoprene units of chamomile sesquiterpenes. **Phytochemistry**, 48: 953-959, 1998.
6. Adamis, P.D.B.; Gomes, D.S.; Pereira, M.D.; Mesquita, J. F.; Pinto, M.L.C.C.; Panek, A.D. Eleutherio, E.C.A. The effect of superoxide dismutase deficiency on cadmium stress. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, 18: 12-17, 2004.
7. Adamis, P.D.B.; Panek, A.D.; Eleutherio, E.C. Vacuolar compartmentation of the cadmium-glutathione complex protects *Saccharomyces cerevisiae* from mutagenesis. **Toxicology Letters**, 173: 1-7, 2007.
8. Agarwal, A.K, Rogers, P.D., Baerson, S.R., Jacob, M.R., Barker, K.S., Cleary, J.D., Walker, L.A., Nagle, D.G., Clark, A.M. Genome-wide expression profiling of the response to polyene, pyrimidine, azole, and echinocandin antifungal agents in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, 278: 34998-35015, 2003.
9. Aguiar, J.S.; Costa, M.C.C.D. *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae): levantamento de publicações nas áreas química, agrônômica e farmacológica, no período de 1979 a 2004. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 8: 79-84, 2005.
10. Aguiar, J.S.; Costa, M.C.C.D.; Nascimento, S.C.; Sena, K.X.F.R. Atividade antimicrobiana de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 18: 436-440, 2008.
11. Ahmad, A.; Khan, A.; Akhtar, F.; Yousuf, S.; Xess, I.; Khan, L.A.; Manzoor, N.

- Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, 30:41-50, 2011.
12. Albesiano, S.; Rangel-Ch., J.O.; Cadena, A. La vegetación del Cañón del río Chicamocha (Santander, Colombia). **Caldasia**, 25: 73-99, 2003.
 13. Ali, B.H.; Ziada, A.; Blunden, G. Biological effects of gum arabic: A review of some recent research. **Food and Chemical Toxicology**, 47: 1-8, 2009.
 14. Allahverdiyev, A.; Duran, N.; Ozguven, M; Koltas, S. Antiviral activity of the volatile oils of *Melissa officinalis* L. against *Herpes simplex* virus type-2. **Phytomedicine**, 11: 657-661, 2004.
 15. Almazan, G.; Liu, H.N.; Khorchid, A.; Sundararajan, S. Martinez-Bermudez, A.K.; Chemtob, S. Exposure of developing oligodendrocytes to cadmium causes HSP72 induction , free radical generation, reduction in glutathione levels, and cell death. **Free Radical Biology & Medicine**, 29: 858-869, 2000.
 16. Almeida, M.C; Alves, L.A.; Souza, L.G.S.; Machado, L.L.; Matos, M.C.; Oliveira, M.C.F.; Lemos, T.L.G. Flavonóides e outras substâncias de *Lippia sidoides* e suas atividades antioxidantes. **Química Nova**, 33: 1877-1881, 2010.
 17. Al-reza, S.M.; Rahman, A.; Lee, J.; Chul, S. Potential roles of essential oil and organic extracts of *Zizyphus jujuba* in inhibiting food-borne pathogens. **Food Chemistry**, 119: 981-986, 2010.
 18. Almeida, P.L.; Naghetini, C.C.; Nunan, E.A.; Junqueira, R.G.; Glória, M.B.A. Atividade antimicrobiana *in vitro* do rizoma em pó, dos pigmentos curcuminóides e do óleo essencial da *Curcuma longa* L. **Ciência e Agrotecnologia**, 32: 875-881, 2008.
 19. Álvares, C.A.; Svidzinski, T.I.E.; Consolaro, M.E.L. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica Laboratorial**, 43 319-327, 2007.
 20. Alves, C.Q.; David, J.M.; David, J.P.; Bahia, M.V.; Aguiar, R.M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, 33: 2202-2210, 2010.
 21. Amorati, R.; Foti, M.C.; Luca Valgimigli, L. Antioxidant activity of essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 61: 10835-10847, 2013.
 22. Amrita, K., Dabur, R.S., Kapoor, C.M. Application of microencapsulation technology in dairy industry. **Indian Food Industry**, 18: 57-64, 1999.
 23. Andrade, V.A.; Almeida, A.C.; Souza, D.S.; Colen, K.J.F.; Macêdo, A.A.; Martins, E.R.; Fonseca, F.S.A.; Santos, R.L. Antimicrobial activity and acute and chronic toxicity of the

- essential oil of *Lippia origanoides*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 34: 1153-1161, 2014.
24. Andrião, M. A.; Pereira, F.C. dos S.; Martins, M.I.E.G. Sacramento, L.V.S. Estimativas de custo de produção e rentabilidade de plantas medicinais: carqueja cultivada no município de Cajuru, Estado de São Paulo. **Informações Econômicas**, SP. 40: 16-26, 2010.
25. Andrighetti-Frohner, R.; Sincero, T.C.M.; Silva, A.S.; Savi, L.A.; Gaido, C.M.; Bettega, J.M.R.; Mancini, M.; Almeida, M.T.R.; Barbosa, R.A.; Farias, M.R.; Barardi, C.R.M.; Simões, C.M.O. Antiviral evaluation of plants from Brazilian Atlantic Tropical Forest. **Fitoterapia**, 76: 374-378, 2005.
26. Apel, M.A.; Sobral, M.; Henriques, A.T. Composição química do óleo volátil de *Myrcianthes* nativas da região sul do Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 16: 402-407, 2006.
27. Araújo, I.B.; Souza, C.A.M.; De-Carvalho, R.R.; Kuriyama, S.N.; Rodrigues, R.P.; Vollmer, R.S.; Alves, E.N.; Paumgarten, F.J.R. Study of the embryofetotoxicity of gamma-terpinene in the rat. **Food and Chemical Toxicology**, 34: 477-482, 1996.
28. Arcila-Lozano, C.C.; Guadalupe, L.P.; Salvador, L.U.; Mejía, E.G. El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, 54: 1-24, 2004.
29. Ara, N.; Nur, M.H.; Amran, M.S.; Wahid, M.I.I.; Ahmed, M. *In vitro* Antimicrobial and cytotoxic activities of leaves and flowers extracts from *Lippia alba*. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, 12: 87-90, 2009.
30. Arango-Bedoya, O.; Hurtado-Benavides, A.M.; Toro-Suárez, I. Efecto del origen, la época de recolección y la edad de las hojas en el rendimiento y el contenido de timol de aceites esenciales de *Lippia origanoides* H.B.K. *Acta Agronómica*, 61: 207-213, 2012.
31. Arora, D.S. and Kaur, J. Antimicrobial activity of spices. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 12: 257-262. 1999.
32. Arthur, H.; Joubert, E.; De Beer, D.; Malherbe, C.J.; Witthuhn, R.C. Phenylethanoid glycosides as major antioxidants in *Lippia multiflora* herbal infusion and their stability during steam pasteurization of plant material. **Food Chemistry**, 127: 581- 588, 2011.
33. Asha, M. K.; Prashanth, D.; Murali, B.; Padmaja, R.; Amit, A. Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum sanctum* and eugenol. **Fitoterapia**, 72: 669-670, 2001.
34. Ashokkumar, D.; Thamilselvan, V.; Senthilkumar, G.P.; Azumder, U.K.; Gupta, M. Antioxidant and free radical scavenging effects of *Lippia nodiflora*. **Pharmaceutical Biology**, 46: 762-771, 2010.

35. Augustin, M.A. and Hemar, Y. Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. **Chemical Society Reviews**, 38: 902-912, 2009.
36. Ayvaz, A.; Sagdic, O.; Karaborklu, S.; Ozturk, I. Insecticidal activity of the essential oils from different plants against three stored-product insects. **Journal of Insect Science**, 10: 1-13, 2010.
37. Azevedo, A. N.; Buarque, P. R.; Cruz, E. M. O.; Blank, A. F.; Alves, P. B.; Nunes, M. L.; Santana, L. C. L. A. Response surface methodology for optimisation of edible chitosan coating formulations incorporating essential oil against several foodborne pathogenic bacteria. **Food Control**, 43: 1-9, 2014.
38. Bajpai, V.K.; Baek K-H.; Kang, S.C. Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review. **Food Research International**, 45: 722-734, 2012.
39. Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, 46: 446-475, 2008.
40. Bang, Y-J., Oh, M.H., Choi, S.H. Distinct characteristics of two 2-Cys Peroxiredoxins of *Vibrio vulnificus* suggesting differential roles in detoxifying oxidative stress. **The Journal of Biological Chemistry**, 287: 42516-42524, 2012.
41. Baranauskien, R.; Venskutonis, P.R.; Dewettinck, K.; Verhe, R. Properties of oregano (*Origanum vulgare* L.), citronella (*Cymbopogon nardus* G.) and marjoram (*Majorana hortensis* L.) flavors encapsulated into milk protein-based matrices. **Food Research International**, 39: 413-425, 2006.
42. Barns, S.M.; Lane, D.J.; Sogin, M.L.; Bibeau, C.; Weisburg, W.G. Evolutionary relationships among pathogenic *Candida* species and relatives. **Journal of Bacteriology**, 173: 2250-2255, 1991.
43. Bassolé, I.H.N. and Juliani, H.R. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. **Molecules**, 17: 3989-4006, 2012.
44. Bassole, I.H.N.; Ouattara, A.S.; Nebie, R.; Ouattara, C.A.T.; Kabore, Z.I. Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso. **Phytochemistry**, 62: 209-212, 2003.
45. Bayala, B.; Bassole, I. H. N. Gnoula, C.; Nebie, R.; Yonli, A.; Morel, L.; Figueredo, G.; Nikiema, J-B.; Lobaccaro. J-M. A. Simpore, J. Chemical composition, antioxidant, anti-inflammatory and anti-proliferative activities of essential oils of plants from Burkina Faso. **Plos one**, 9: e92122, 2012.
46. Benoit-Vical, F.; Imbert, C.; Bonfils, J. P.; Sauvaire, Y. Antiplasmodial and antifungal activities of iridal, a plant triterpenoid. **Phytochemistry**, 62: 747-751, 2003.
47. Berger-Bächli, B. Resistance mechanisms of Gram-positive bacteria. **International**

- Journal of Medical Microbiology**, 292: 27-35, 2002.
48. Betancur-Galvis, L.; Zapata, B.; Baena, A.; Bueno, J.; Ruíz-Nova, C.A.; Stashenko, E, Mesa-Arango, A.C. Antifungal, cytotoxic and chemical analyses of essential oils of *Lippia origanoides* H.B.K grown in Colombia. **Salud UIS**, 43: 141-148, 2011.
 49. Beyersmann, D. and Hartwig, A. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. **Archives of Toxicology**, 82: 493-512, 2008.
 50. Binder, U. and Lass-Flörl, C. Epidemiology of invasive fungal infections in the mediterranean area. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, 3: e20110016, 2011.
 51. Bizzo, H. R.; Hovell, A. M. C.; Rezende, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, 32: 588-594, 2009.
 52. Blanco, M.; Colareda, G.; van Baren, C.; Bandoni, A.L.; Ringuélet, J.; Consolini, A.E.; Antispasmodic effects and composition of the essential oils from two South American chemotypes of *Lippia alba*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 149: 803-9, 2013.
 53. Bohlmann, J.; Meyer-Gauen, G.; Croteau, R. Plant terpenoid synthases: molecular biology and phylogenetic analysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 95: 4126-4133, 1998.
 54. Borges, A.R.; Aires, J.R.A.; Higino, T.M.M.; Medeiros, M.G.F.; Citó, A.M.G.L.; Lopes, J.A.D.; Figueiredo, R.C.B.Q. Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil. **Experimental Parasitology**, 132: 123-128, 2012.
 55. Botelho, M.A.; Bastos, G.M.; Montenegro, D.; Heukelbach, J.; Rao, V.S. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 40: 349-356, 2007.
 56. Bouzidi, L. E.; Jamali, C. A., Bekkouche, K.; Hassani, L.; Wohlmuth, H.; Leach, D.; Abbad, A. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oils obtained from wild and cultivated Moroccan *Thymus* species. **Industrial Crops and Products**, 43: 450-456, 2013.
 57. Brant, R.S.; Pinto, J.E.B.P.; Bertolucci, S.K.V.; Albuquerque, C.J.B. Essential oil content of *Aloysia triphylla* (L'Her) Britton in function of seasonal variation. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 10: 83-88, 2008.
 58. Brasil. Decreto nº 5.813 de 22 de Junho de 2006. Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos. Ministério da Saúde, Brasília, 2006.
 59. Brasil. Portaria MS/GM nº 971 de 3 de Maio de 2006. Política Nacional de Práticas

- Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. Brasília, 2006.
60. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica, 2012. 156 p. : il. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos) (Cadernos de Atenção Básica ; n. 31).
 61. Brennan, R.J. and Schiestl, R.H. Cadmium is an inducer of oxidative stress in yeast. **Mutation Research**, 356: 171-178, 1996.
 62. Brennan, R.J. and Schiestl, R.H. Free radicals generated in yeast by the *Salmonella* test-negative carcinogens benzene, urethane, thiourea and auramine O. **Mutation Research**, 403: 65-73, 1998.
 63. Bueno-Sánchez, J.G.; Martínez-Morales, J.R.; Stashenko, E.E.; Ribón, W. Anti-tubercular activity of eleven aromatic and medicinal plants occurring in Colombia. **Biomédica**, 29: 51-60, 2009.
 64. Burt, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology**, 94: 223-253, 2004.
 65. Burt, S. A.; Vlieland, R.; Haagsman, H. P.; Veldhuizen, E. J. A. Increase in activity of essential oil components carvacrol and thymol against *Escherichia coli* O157:H7 by addition of food stabilizers. **Journal of Food Protection**, 68: 919-926, 2005.
 66. Burt, S.A; van der Zee, R.; Koets, A.P.; De Graaff, A.M.; van Knapen; Gaastra, W.; Haagsmann, H.P.; Veldhuizen, E.J.A. Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibit synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. **Applied and Environmental Microbiology**, 73: 4484-4490, 2007.
 67. Caballero-Gallardo, K.; Olivero-Verbel, J.; Stashenko, E.E. Repellency and toxicity of essential oils from *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon flexuosus* and *Lippia origanoides* cultivated in Colombia against *Tribolium castaneum*. **Journal of Stored Products Research**, 50: 62-65, 2012.
 68. Caceres, A.; Alvarez, A.V.; Ovando, A.E.; Samayoa, B.E. Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases. Screening of 68 plants against Gram-positive bacteria. **Journal of Ethnopharmacology**, 31:193-208, 1991.
 69. Cadot, C.; Tran, S-L.; Vignaud, M-L.; Buyser, M.L; Kolstø, A-B.; Brisabois, A. Nguyen-Thé, C.; Lereclus, D.; Guinebretière, M-H.; Ramarao, N. InhA1, NprA, and HlyII as candidates for markers to differentiate pathogenic from nonpathogenic *Bacillus cereus* strains. **Caldasia**, 25: 73-99, 2010.
 70. Campbell, B.C.; Chan, K.L.; Kim, J.H. Chemosensitization as a means to augment commercial antifungal agents. **Frontiers in Microbiology**, 3: 1-20, 2012.

71. Camurça-Vasconcelos, A.L.F.; Bevilaqua, C.M.L.; Morais, S.M.; Maciel, M.V.; Macedo, I.T.F.; Oliveira, L.M.B.; Braga, R.R.; Vieira, L.S. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. **Veterinary Parasitology**, 148: 288-294, 2008.
72. Cansian, R.L.; Mossi, A.J.; Oliveira, D.; Toniazzo, G.; Treichel, H.; Paroul, N.; Astolfi, V.; Serafini, L. A. Atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de ho-sho (*Cinnamomum camphora* Ness e Eberm Var. *Linaloolifera fujita*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 30: 378-384, 2010.
73. Cardoso, S.L. Fotofísica de carotenóides e o papel antioxidante de β -caroteno. **Química Nova**, 20: 535-540, 1997.
74. Carmona, F.; Angelucci, M.A.; Sales, D.S.; Chiaratti, T.M.; Honorato, F.B.; Bianchi, R.V.; Pereira, A.M.S. *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown hydroethanolic extract of the leaves is effective in the treatment of migraine in women. **Phytomedicine**, 20: 947-950, 2013.
75. Carvalho Filho, J. L. S.; Blank, A. F.; Alves, P. B.; Ehlert, P. A. D.; Melo, A. S.; Cavalcanti, S. C. H.; Arrigoni-Blank, M. F.; Silva-Mann, R. Influence of the harvesting time, temperature and drying period on basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 16: 24-30, 2006.
76. Carvalho, A.F.U.; Melo, V.M.M.; Craveiro, A.A.; Machado, M.I.L.; Bantim, M.B.; Rabelo, E.F. Larvicidal Activity of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. against *Aedes aegypti* Linn. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 98: 569-571, 2003.
77. Castro, C.E.; Ribeiro, J.M.; Diniz, T.T.; Almeida, A.C.; Ferreira, L.C.*; Martins, E.R.; Duarte, E.R. Antimicrobial activity of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 13: 293-297, 2011.
78. Chorianopoulos, N.; Kalpoutzakis, E.; Aligiannis, N.; Mitaku, S.; Nychas, G.-J.; Haroutounian, S. A. Essential oils of *Satureja*, *Origanum*, and *Thymus* species: chemical composition and antibacterial activities against foodborne pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52: 8261-8267, 2004.
79. Cleff, M.B.; Meinerz, A.R.; Sallis, E.S.; Antunes, T.A.; Mattei, A.; Rodrigues, M.R.; Meireles, M.C.A.; Mello, J.R.B. Toxicidade pré-clínica em doses repetidas do óleo essencial do *Origanum vulgare* L. (Orégano) em ratas Wistar. **Latin American Journal of Pharmacy**, 27: 704-9, 2008.
80. Chung, S.K.; Seo, J.Y.; Lim, J.H.; Park, H.H.; Yea, M.J.; Park, H.J. Microencapsulation of essential oil for insect repellent in food packaging system. **Journal of Food Science**,

- 78: E709-E714, 2013.
81. Clarkson, C.; Maharaj, V.J.; Crouch, N.R.; Grace, O.M.; Pillay, P.; Matsabisa, M.G.; Bhagwandin, N.; Smith, P.J.; Folb, P.I. *In vitro* antiplasmodial activity of medicinal plants native to or naturalized in South Africa. **Journal of Ethnopharmacology**, 92: 177-191, 2004.
 82. Cloete, T.E. Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 51: 277-282, 2003.
 83. Cox, S.D.; Mann, C.M.; Markham, J.L.; Bell, H.C.; Gustafson, J.E.; Warmington, J.R.; Wyllie, S.G. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of Applied Microbiology**, 88: 170-175, 2000.
 84. Cruz, E.M.O.; Martins, C.L.; Oliveira, P.J.A.S.; Santos, D.A.; Araujo, S.A.; Arrigoni-Blank, M.F.; Bacci, L.; Alves, P.B.; Cavalcanti, S.C.H.; Blank, A.F. Acaricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary parasitology**, 195: 198-202, 2013.
 85. Daferera, D. J.; Ziogas, B. N.; Polissiou, M. G. GC-MS Analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 48: 2576-2581, 2000.
 86. Daferera, D.J., Ziogas, B.N., Polissiou, M.G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium sp.* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Crop Protection**, 22: 39-44, 2003.
 87. Damasceno, E.I.T.; Silva, J.K.R.; Andrade, E.H.A.; Sousa, P.J.C.; Maia, J.G.S. Antioxidant capacity and larvicidal activity of essential oil and extracts from *Lippia grandis* Schauer, Verbenaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 21: 78-85, 2011.
 88. Dasgupta, N.; Bratati, D. Antioxidant activity of *Piper betle* L. leaf extract *in vitro*. **Food Chemistry**, 88: 219-224, 2004.
 89. David, J.P.; Meira, M.; David, J.M.; Brandão, H.N.; Branco, A.; Agra, M.F.; Barbosa, M.R.V.; Queiroz, L.P.; Giulietti, A.M. Radical scavenging, antioxidant and cytotoxic activity of Brazilian caatinga plants. **Fitoterapia**, 78: 215-218, 2007.
 90. De Martinis, E.C.P.; Franco, B.D.G.M., Inhibition of foodborne by bacteriocin-producing *Leuconostoc sp.* and *Lactobacillus sake* isolated from "lingüiça frescal". **Revista de Microbiologia**, 28: 284-287, 1997.
 91. Decousser, J-W.; Ramarao, N.; Duport, C.; Dorval, M.; Bourgeois-Nicolaos, N.; Guinebrière, M-H.; Razafimahefa, H.; Doucet-Populaire, F. *Bacillus cereus* and severe intestinal infections in preterm neonates: Putative role of pooled breast milk. **American Journal of Infection Control**, 41: 918-21, 2013.

92. Devasagayam, P.A.; Tilak, J.C; Bolor, K.K.; Sane, K.S.; Ghaskadbi, S.S.; Lele, R.D. Free radicals and antioxidants in human health: Current status and future prospects. **Japi**, 52: 794-804, 2004.
93. Devi, K.P.; Nisha, S.A.; Sakthivel, R.; Pandian, S.K. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. **Journal of Ethnopharmacology**, 130: 107-115, 2010.
94. Di Stasi, L. C.; Hiruma-Lima, C. A. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. 2. ed. São Paulo: Editora Universidade Estadual Paulista, p. 434-448, 2002.
95. Dias, C. N.; Alves, L. P. L.; Rodrigues, K. A. F.; Brito, M. C. A.; Rosa, C. S.; Amaral, F. M. M.; Monteiro, O. S.; Andrade, E. H. A.; Maia, J. G. S.; Moraes, D. F. C. Chemical composition and larvicidal activity of essential oils extracted from Brazilian Legal Amazon plants against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Hindawi Publishing Corporation**, 2015: 1-8, 2015.
96. Dimayuga, R.E.; Garcia, K.S. Antimicrobial screening of medicinal plants from Baja California Sur, Mexico. **Journal of Ethnopharmacology**, 31: 181-192, 1991.
97. Doke, S.K.; Raut, J.S.; Dhawale, S.; Karuppayil, S.M. Sensitization of *Candida albicans* biofilms to fluconazole by terpenoids of plant origin. **The Journal of General and Applied Microbiology**, 60: 163-168, 2014.
98. Dorman, H.J.D.; Deans, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, 88: 308-316, 2000.
99. Duarte, M.C.T.; Figueira, G. M.; Sartoratto, A.; Rehder, V.L.G.; Delarmelina, C. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, 97: 305-11, 2005.
100. Dunkley, K.D.; Callaway, T.R.; Chalova, V.I.; McReynolds, J.L.; Humeb, M.E.; Dunkley, C.S.; Kubena, L.F.; Nisbet, D.J.; Ricke, S.C. Foodborne *Salmonella* ecology in the avian gastrointestinal tract. **Anaerobe**, 15: 26-35, 2009.
101. Dzhavakhiya, V.; Shcherbakova, L.; Semina, Y.; Zhemchuzhina, N.; Campbell, B. Chemosensitization of plant pathogenic fungi to agricultural fungicides. **Frontiers in Microbiology**, 3: 1-9, 2012.
102. Dzoyem, J. P.; Eloff, J. N. Anti-inflammatory, anticholinesterase and antioxidant activity of leaf extracts of twelve plants used traditionally to alleviate pain and inflammation in South Africa. **Journal of Ethnopharmacology**, 160: 194-201.
103. El-Hawary, S.S.; Yousif, M.F.; Motaal, A.A.A.; Abd-hameed, L.M. Bioactivities, phenolic compounds and in-vitro propagation of *Lippia citriodora* Kunth cultivated in Egypt Bulletin of Faculty of Pharmacy, **Cairo University**, 50: 1-6, 2012.

- 104.Elledge, S.J., Zhou, Z and Allen, J.B. Ribonucleotide reductase: regulation, regulation, regulation. **Trends in Biochemical Science**, 17: 119-123, 1992.
- 105.Endo-Ichikawa, Y., Kohno, H., Furukawa, T, Ueda, T., Ogawa, Y., Tokunaga, R., Taketani, S. Requirement of multiple DNA-protein interactions for inducible expression of *RNR3* gene in *Saccharomyces cerevisiae* in response to DNA damage. **Biochemistry and Biophysical Research Communications**, 222:280-286, 1996.
- 106.Escobar, P.; Leal, M.S.; Herrera, L.V.; Martinez, J.R.; Stashenko, E. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp essential oils and their major components. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 105: 184-190, 2010.
- 107.Fang, Z.; Bhandari, B. Encapsulation of polyphenols - a review. *Trends in Food Science and Technology*, 21: 510-523, 2010.
- 108.Faria, N.C.G.; Kim, J.H.; Gonçalves, L.A.P.; Martins, M.L.; Chan, K.L.; Campbell, B.C. Enhanced activity of antifungal drugs using natural phenolics against yeast strains of *Candida* and *Cryptococcus*. **Letters in Applied Microbiology**, 52: 506-513, 2011.
- 109.Farias, E.M.F.G; Ximenes, R.M.; Magalhães, L.P.M.; Chiappeta, A.A.; Sena, K.X.F.R; Albuquerque, J.F.C. Antifungal activity of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) against clinical isolates of *Candida* species. **Journal of Herbal Medicine**, 2: 63-67, 2012.
- 110.Fletcher, J.P.; Cassella, J.P.; Hughes, D.; Cassella, S. An evaluation of the mutagenic potential of commercially available tea tree oil in the United Kingdom. **The International Journal of Aromatherapy**, 15: 81-86, 2005.
- 111.Farias-Júnior, P.A.; Rios, M.C.; Moura, T.A.; Almeida, R.P.; Alves, P.B.; Blank, A.F.; Fernandes, R.P.M.; Scher, R. Leishmanicidal activity of carvacrol-rich essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Biological Research**, 45: 399-402, 2012.
- 112.Favaro-Trindade, C. S.; Pinho, S. C.; Rocha, G. A. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, 11: 103-112, 2008.
- 113.Ferreira, A.L.A.; Matsubara, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, 43: 61-8, 1997.
- 114.Fontenelle, R.O.S.; Morais, S.M.; Brito, E.H.S.; Kerntopf, M.R.; Brilhante, R.S.N.; Cordeiro, R.A.; Tomé, A.R.; Queiroz, M.G.R., Nascimento, N.R. F.; Sidrim, J.J.C., Rocha, M. F. G. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 59: 934-940, 2007.
- 115.Forestieri, A.M.; Monforte, M.T.; Ragusa, S.; Trovato, A.; Iauk, L. Antiinflammatory, analgesic and antipyretic activity in rodents of plant extracts used in african medicine.

- Phytotherapy Research**, 10: 100-106, 1996.
- 116.França, B.K.; Alves, M.R.M.; Souto, F.M.S.; Tiziane, L.; Boaventura, R.F.; Guimarães, A.; Alves Jr, A. Peroxidação lipídica e obesidade: Métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. **Jornal Português de Gastrenterologia**, 20: 199-206, 2013.
- 117.Freires, I.A.; Bueno-Silva, B.; Galvão, L.C.C.; Duarte, M.C.T.; Sartoratto, A.; Figueira, G.M.; Alencar, S.M.; Rosalen, P. L. The effect of essential oils and bioactive fractions on *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* Biofilms: A confocal analysis. **Hindawi Publishing Corporation**, 2015: 1-9, 2015b.
- 118.Freires, I.A.; Denny, C.; Benso, B.; Alencar, S.M.; Rosalen, P.L. Antibacterial activity of essential oils and their isolated constituents against cariogenic bacteria: a systematic review. **Molecules**, 20: 7329-7358, 2015a.
- 119.Freires, I.A.; Murata, R.M.; Furletti, V.F.; Sartoratto, A.; Alencar, S.M.; Figueira, G.M.; Rodrigues, J.A.O.; Duarte, M.C.T.; Rosalen, P.L. *Coriandrum sativum* L. (Coriander) essential oil: Antifungal activity and mode of action on *Candida* spp., and molecular targets affected in human whole-genome expression. **Plos One**, 9: e99086, 2014.
- 120.Fu, Y.; Zu, YG.; Chen, LY.; Shi, XG.; Wang, Z.; Sun, S.; Efferth, T. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. **Phytotherapy Research**, 21: 989-994, 2007.
- 121.Funari, C.S.; Gullo, F.P.; Napolitano, A.; Carneiro, R.L.; Mendes-Giannini, M.J.S. Chemical and antifungal investigations of six *Lippia* species (Verbenaceae) from Brazil. **Food Chemistry**, 135: 2086-9204, 2012.
- 122.Garozzo, A.; Timpanaro, R.; Bisignano, B.; Furneri, P. M.; Bisignano, G.; Castro, A. In vitro antiviral activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil. **Letters in Applied Microbiology**, 49: 806-808, 2009.
- 123.Gasquet, M.; Delmas, F.; Timon-David, P.; Keita, A.; Guindo, M.; Koita, N.; Diallo, D.; Doumbo, O. Evaluation in vitro and *in vivo* of a traditional antimalarial, Malarial-5. **Fitoterapia**, 64: 423-426, 1993.
- 124.Gharieb, M.M. and Gadd, G.M. Role of glutathione in detoxification of metals by *Saccharomyces cerevisiae*. **Bio Metals**, 17: 183-188, 2004.
- 125.Gharsallaoui, A.; Roudaut G.; Chambin, O.; Voilley, A.; Saurel, R. **Food Research International**, 40: 1107, 2007.
- 126.Giaginis, C.; Gatzidou, E.; Theocharis, S. DNA repair systems as targets of cadmium toxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 213: 282-290, 2006.
- 127.Gomes, D.S.; Fragoso, L.C.; Riger, C.J.; Panek, A.D.; Eleutherio, E.C.A. Regulation of cadmium uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1573:

- 21-25, 2002.
128. Gomes, S.V.F.; Nogueira, P.C.L.; Moraes, V.R.S. Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer. **Eclética Química**, 36: 64-77, 2011.
129. Görnemann, T.; Nayal, R.; Pertz, H.H.; Melzig, M.F. Antispasmodic activity of essential oil from *Lippia dulcis* Trev. **Journal of Ethnopharmacology**, 117: 166-169, 2008.
130. Gorzalczany, S.; Sülsen, V.; Redko, F.; Vescina, C.; Muschietti, L.; Martino, V.; Acevedo, C. Choleric and antispasmodic effects of *Lippia integrifolia* aqueous extract. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 18: 16-20, 2008.
131. Gouin, S. Micro-encapsulation: Industrial appraisal of existing technologies and trends. **Trends in Food Science & Technology**: 15, 330-347, 2004.
132. Guilhon, C.C.; Raymundo, L.J.R.P.; Alviano, D.S.; Blank, A.F.; Arrigoni-Blank, M.F.; Matheus, M.E.; Cavalcanti, S.C.H.; Alviano, C.S. Fernandes, P.D. Characterisation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities and the mechanism of the action of *Lippia gracilis* essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**, 135: 406-413, 2011.
133. Guimarães, L. G. L.; Cardoso, M. G.; Souza, R. M.; Zacaroni, A. B.; Santos, G. R. Essential oil of *Lippia sidoides* native to Minas Gerais: Composition, secretory structures and antibacterial activity. **Revista Ciência Agronômica**, 45: 267-275, 2014.
134. Guleria, S.; Tiku, K.; Koul, A.; Gupta, S.; Singh, G.; Razdan, V. K. Antioxidant and antimicrobial properties of the essential oil and extracts of *Zanthoxylum alatum* grown in north-western Himalaya. **The Scientific World Journal**, 2013: 1-9, 2013.
135. Haas, I.G. BiP (GRP78), an essential hsp70 resident protein in the endoplasmic reticulum. **Experientia**, 50: 1012-1020, 1994.
136. Halliwell, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiology**, 141: 312-322, 2006.
137. Halliwell, B.; Chirico, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 57: 715-725, 1993.
138. Hennebelle, T.; Sahpaz, S.; Joseph, H.; Bailleul, F. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. **Journal of Ethnopharmacology**, 116: 211-222, 2008.
139. Hernández, N.E.; Tereschuk, M.L.; Abdala, L.R. Antimicrobial activity of flavonoids in medicinal plants from Tafí del Valle (Tucumán, Argentina). **Journal of Ethnopharmacology**, 73: 317-322, 2000.
140. Herrero, E.; Ros, J.; Bellí, G.; Cabiscol, E. Redox control and oxidative stress in yeast cells. **Biochimica end Biophysica Acta**, 1780: 1217-1235, 2008.
141. Huber, P.C.; Almeida, W.P. Glutathiona e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, 31: 51-54, 2008.

142. Hughes, T.R. Yeast and drug discovery. **Function & Integrative Genomics**, 2:199-211, 2002.
143. Jafari, S.M.; Assadpoor, E.; Bhandari, B.; He, Y. Nano-particle encapsulation of fish oil by spray drying. **Food Research International**, 41: 172-183, 2008.
144. Jia, X.; Zhu, Y.; Xiao, W. A stable and sensitive genotoxic testing system based on DNA damage induced gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mutation Research**, 519: 83-92, 2002.
145. Juven, B.J.; Kanner, J.; Schved, F.; Weisslowicz, H. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. **Journal of Applied Bacteriology**, 76: 626-631, 1994.
146. Jux, A.; Gleixner, G.; Boland, W. Classification of Terpenoids according to the Methylerythritolphosphate or the Mevalonate Pathway with Natural ¹²C/¹³C Isotope ratios: dynamic allocation of resources in induced plants. **Angewandte Chemie International Edition**, 40: 2091-2093, 2001.
147. Kanafani, Z.A. and Perfect J.R. Resistance to antifungal agents: Mechanisms and clinical impact. **Antimicrobial Resistance**, 46: 120-128, 2008.
148. Kerrola, K.; Galambosi, B.; Kallio, H. Volatile Components and odor intensity of four phenotypes of Hyssop (*Hyssopus officinalis* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 42: 776-781, 1994.
149. Khan, A.; Ahmad, A.; Akhtar, F.; Yousuf, S.; Xess, I.; Khan, L.A.; Manzoor, N. Induction of oxidative stress as a possible mechanism of the antifungal action of three phenyl propanoids. **FEMS Yeast Research**, 11: 114-122, 2011.
150. Khan, A.; Ahmad, A.; Akhtar, F.; Yousuf, S.; Xess, I.; Khan, L.A.; Manzoo, N. *Ocimum sanctum* essential oil and its active principles exert their antifungal activity by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity. **Research in Microbiology**, 161: 816-823, 2010.
151. Khan, A.; Ahmad, A.; Khan, L.A. Padoa, C.J.; van Vuuren, S.; Manzoor, N. Effect of two monoterpene phenols on antioxidant defense system in *Candida albicans*. **Microbial Pathogenesis**, 80: 50-56, 2015.
152. Kordali, S.; Cakir, A.; Ozer, H.; Cakmakci, R.; Kesdek, M.; Mete, E. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and *p*-cymene. **Bioresource Technology**, 99: 8788-8795, 2008.
153. Krishnan, S.; Bhosale, R.; Singhal, R.S. Microencapsulation of cardamom oleoresin: Evaluation of blends of gum arabic, maltodextrin and a modified starch as wall materials.

- Carbohydrate Polymers**, 61: 95-102, 2005.
154. Kunle, O.; Okogun, J.; Egamana, E.; Emojevwe, E.; Shok, M. Antimicrobial activity of various extracts and Carvacrol from *Lippia multiflora* leaf extract. **Phytomedicine**, 10: 59-61, 2003.
155. Lacoste, E.; Chaumont, J.P.; Mandin, D.; Plumel, M.M.; Matos, F.J. Antiseptic properties of essential oil of *Lippia sidoides* Cham. Application to the cutaneous microflora. **Annales Pharmaceutiques Francaises**, 54: 228-230, 1996.
156. Lambert, R.J.W.; Skandamis, P.N.; Coote, P.J.; Nychas, G.-J.E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, 91: 453-462, 2001.
157. Lee, J.H.; Choi, I.Y.; Kil, I.S.; Kim, S.Y.; Yang, E.S.; Park, J.-W. Protective role of superoxide dismutases against ionizing radiation in yeast. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1526: 191-198, 2001.
158. Leistner, L. and Gorris, L.G.M. Food preservation by hurdle technology. **Trends in Food Science & Technology**, 6: 41-46, 1995.
159. Leistner, L. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. **International Journal of Food Microbiology**, 55: 181-186, 2000.
160. Leitão, S.G.; Oliveira, D.R.; Sülsen, V.; Martino, V.; Barbosa, Y.G.; Bizzo, H.R.; Lopes, D.; Viccini, L.F.; Salimena, F.R.G.; Peixoto, P.H.P.; Leitão, G.G. Analysis of the chemical composition of the essential oils extracted from *Lippia lacunose* Mart. & Schauer and *Lippia rotundifolia* Cham. (Verbenaceae) by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 19: 1388-1393, 2008.
161. Lemos, T.L.; Craveiro, A.A.; Alencar, J.W.; Matos, F.J.; Clarck, A.M.; MacChesney, J.D. Antimicrobial activity of essential oil of Brazilian plants. **Phytotherapy Research**, 4: 82-84, 1990.
162. Lemos, T.L.G., Monte, F.J.Q., Matos, F.J.A., Alencar, J.W., Craveiro, A.A., Barbosa, R.C.S.B. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from Brazilian plants. **Fitoterapia**, 63: 266-268, 1992.
163. Linde, J.H.; Combrinck, S.; Regnier, T.J.C.; Virijevic, S. Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Lippia rehmannii* from South Africa. **South African Journal of Botany**, 76: 37-42, 2010.
164. Liolios, C.C.; Gortzi, O.; Lalas, S.; Tsaknis, J.; Chinou, I. Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and *in vitro* antimicrobial activity. **Food Chemistry**, 112: 77-83, 2009.

165. **Lista de Espécies da Flora do Brasil.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 01 Dez. 2015.
166. Liu, T.T.; Lee, R.E.; Barker, K.S.; Wei, L.; Homayouni, R.; Rogers, P.D. Genome-wide expression profiling of the response to azole, polyene, echinocandin, and pyrimidine antifungal agents in *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 49: 2226-2236, 2005.
167. López, A.; Castro, S.; Andina, M.J.; Ures, X.; Munguía, B.; Llabot, J.M. Elder, H.; Dellacassa, E.; Palma, S.; L. Domínguez, L. Insecticidal activity of microencapsulated *Schinus molle* essential oil. **Industrial Crops and Products**, 53: 209-216, 2014.
168. Lorenzi, H.; Matos, F.J.A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas. São Paulo, Instituto Plantarum de estudos da Flora, Nova Odessa, 2002, 544p.
169. Lubbe, A. and Verpoorte, R. Cultivation of medicinal and aromatic plants for specialty industrial materials. **Industrial Crops and Products**, 34: 785-801, 2011.
170. Madene, A.; Jacquot, M.; Scher, J.; Desobry, S. Flavour encapsulation and controlled release - a review. **International Journal of Food Science and Technology**, 41: 1-21, 2006.
171. Maia, A.A.; Cantisani, M.L.; Esposto, E.M.; Silva, W.C.P.; Rodrigues, E.C.P.; Rodrigues, D.P.; Lázaro, N.S. Resistência antimicrobiana de *Pseudomonas aeruginosa* isolados de pescado e de cortes e de miúdos de frango. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 29: 114-119, 2009.
172. Mallie, M.; Bastide, J.M. Composition and antimalarial activity *in vitro* of volatile components of *Lippia multiflora*. **Phytochemistry**, 40: 1439-1442, 1995.
173. Manenzhe, N.J.; Potgieter, N.; van Ree, T. Composition and antimicrobial activities of volatile components of *Lippia javanica*. **Phytochemistry**, 65: 2333-2336, 2004.
174. Manohar, V.; Ingram, C.; Gray, J.; Talpur, N.A.; Echard, B.W.; Bagchi, D.; Preuss, H.G. Antifungal activities of *Origanum* oil against *Candida albicans*. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 228: 111-117, 2001.
175. Marcial, G.; Sendker, J.; Brandt, S.; Lampasona, M. P.; Catalán, C. A. N.; Valdez, G. F.; Hensel, A. Gastroprotection as an example: Antiadhesion against *Helicobacter pylori*, anti-inflammatory and antioxidant activities of aqueous extracts from the aerial parts of *Lippia integrifolia* Hieron. **Journal of Ethnopharmacology**, 155: 1125-1133, 2014.
176. Marino, M.; Bersani, C.; Comi, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. **International Journal of Food Microbiology**, 67: 187-195, 2001.
177. Martins, N.; Barros, L.; Henriques, M.; Silva, S. Activity of phenolic compounds from

- plant origin against *Candida* species. **Industrial Crops and Products**, 74: 648-670, 2015.
178. Masotti, V.; Juteau, F.; Bessiere, J. M.; Viano, J. Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51: 7115-7121, 2003.
179. Matos, F.J.A., Oliveira, F. *Lippia sidoides* Cham. - farmacognosia, química e farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 79:84-87, 1998.
180. Megarvey, D.J.; Croteau, R. Terpenoid metabolism. **The Plant Cell**, 7: 1015-1026, 1995.
181. Mendes, S.S.; Bomfim, R.R.; Jesus, H.C.R.; Alves, P.B. Blank, F.; Estevam, C.S.; Antonioli, R.; Thomazzi, S.M. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, 129: 391-397, 2010.
182. Menezes, R.; Ocazonez, R.E.; Martínez, J.R.; Stashenko, E.E. Inhibitory effect of essential oils obtained from plants grown in Colombia on yellow fever virus replication in vitro. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, 8: 6-8, 2009a.
183. Menezes, R.; Torres, F.A.; Stashenko, E.; Ocazonez, R.E.; Aceites esenciales de plantas colombianas inactivan el virus del dengue y el virus de la fiebre amarilla. **Salud UIS**, 41: 236-243, 2009b;
184. Mevy, J.P.; Bessiere, J.M.; Dherbomez, M.; Millogo, J.; Viano, J. Chemical composition and some biological activities of the volatile oils of chemotype of *Lippia chevalieri* Moldenke. **Food Chemistry**, 101: 682-685, 2007.
185. Michiels, C.; Raes, M.; Toussaint, O.; Remacle, J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. **Free Radical Biology & Medicine**, 17: 235-248, 1994.
186. Millezi, A.F.; Baptista, N.N.; Caixeta D.S.; Rossoni D.F.; Cardoso M.G.; Piccoli, R.H. Caracterização e atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas condimentares e medicinais contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinas**, 15: 373-379, 2013.
187. Monteiro, M.V.B.; Leite, A.K.R.M.; Bertini, L.M.; Morais, S.M.; Nunes-Pinheiro, D.C.S. Topical anti-inflammatory, gastroprotective and antioxidant effects of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, 11: 378-382, 2007.
188. Morales-Soto, A.; Oruna-Concha, M.J.; Elmore, J.S.; Barrajón-Catalán, E.; Micol, V.; Roldán, C.; Segura-Carretero, A. Volatile profile of Spanish *Cistus* plants as sources of antimicrobials for industrial applications. **Industrial Crops and Products**, 74: 425-433, 2015.
189. Moser, V.C. Functional assays for neurotoxicity testing. **Toxicologic Pathology**, 39: 3645,

- 2010.
- 190.Mota, R. A.; Silva, K. P. C.; Freitas, M. F. L.; Porto, W. J. N.; Silva, L. B. G. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 42: 465-470, 2005.
- 191.Mukinda, J.T. and Syce, J.A. Acute and chronic toxicity of the aqueous extract of *Artemisia afra* in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, 112: 138-144, 2007.
- 192.Mourey, A.; Canillac, N. Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. **Food Control**, 13: 289-292, 2002.
- 193.Nagao, E.O.; Innecco, R.; Mattos, S.H.; Filho, S.M.; Marco, C.A. Efeito do horário de colheita sobre o teor e constituintes majoritários de óleo essencial de *Lippia alba* (Mill) N.E.Br., quimiotipo citral-limoneno. **Revista Ciência Agronômica**, 35: 355-360, 2004.
- 194.Nascimento, P.F.C.; Nascimento, A.C.; Rodrigues, C.S.; Antonioli, A.R.; Santos, P.O.; Barbosa Júnior, A.M.; Trindade, R. C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 17: 108-113, 2007.
- 195.Nelson, G. Application of microencapsulation in textiles. **International Journal of Pharmaceutics**, 242: 55-62, 2002.
- 196.Nerio, L.S.; Olivero-Verbel, J.; Stashenko, E.E. Repellent activity of essential oils from seven aromatic plants grown in Colombia against *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera). **Journal of Stored Products Research**, 45: 212-214, 2009.
- 197.Neto, R.M.; Matos, F.J.A.; Andrade, V.S.; Melo, M.C.N.; Carvalho, C.B.M.; Guimarães, S.B.; Pessoa, O.D.L.; Silva, S.L.; Silva, S.F.R.; Vasconcelos, P.L.R. The essential oil from *Lippia gracilis* Schauer, Verbenaceae, in diabetic rats. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 20: 261-266, 2010.
- 198.Nordberg, J. and Arnér, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, 31: 1287-1312, 2001.
- 199.Nostro, A.; Blanco, A. R.; Cannatelli, M. A.; Enea, V.; Flamini, G.; Morelli, I.; Roccaro, A. S.; Alonzo, V. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. **FEMS Microbiology Letters**, 230:191-195, 2004.
- 200.Nostro, A.; Roccaro, A. S.; Bisignano, G.; Marino, A.; Cannatelli, M. A.; Pizzimenti, F. C.; Cioni, P. L.; Procopio, F.; Blanco, A. R. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Journal of Medical Microbiology**, 56: 519-523, 2007.
- 201.Nugroho, L. H.; Verpoorte, R. Secondary metabolism in tobacco. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 68: 105-125, 2002.

202. Nunes, X.P.; Silva, F.S.; Almeida, J.R.G.S.; Lima, J.T.; Ribeiro, L.A.A.; Quintans Júnior, L.J.; Barbosa Filho, J.M. Biological oxidations and antioxidant activity of natural products. Phytochemicals as nutraceuticals - Global approaches to their role in nutrition and health, Dr Venketeshwer Rao (Ed.), ISBN: 978-953-51-0203-8, 2012.
203. Ocazonez, R. E.; Meneses, R.; Torres, F. A.; Stashenko, E. E. Virucidal activity of Colombian *Lippia* essential oils on dengue virus replication in vitro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 105: 304-309, 2010.
204. Oke, F.; Aslim, B.; Ozturk, S.; Altundag, S. Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja cuneifolia* Ten. **Food Chemistry**, 112: 874-879, 2009.
205. Oladimeji, F.A.; Orafidiya, L.O.; Okeke, I.N. Physical properties and antimicrobial activities of leaf essential oils of *Lippia multiflora* Moldenke. **The International Journal of Aromatherapy**, 14: 162-168, 2004.
206. Oliveira, D.R.; Leitão, G.G.; Santos, S.S.; Bizzo, H.R.; Lopes, D.; Alviano, C.S.; Alviano, D.S.; Leitão, S.G. Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximiná, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, 108: 103-108, 2006a.
207. Oliveira, F.P.; Lima, E.O.; Siqueira Júnior, J.P.; Souza, E.L.; Santos, B.H.C.; Barreto, H.M. Effectiveness of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical material. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 16: 510-516, 2006b.
208. Oliveira, D.R.; Leitão, G.G.; Bizzo, H.R.; Lopes, D.; Alviano, D.S.; Alviano, C.S.; Leitão, S.G. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K. **Food Chemistry**, 101: 236-240, 2007.
209. Oliveira, D.R.; Leitão, G.G.; Fernandes, P.D.; Leitão, S.G. Ethnopharmacological studies of *Lippia origanoides*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 24: 206-214, 2014.
210. Olivero-Verbel, J.; Caballero-Gallardo, K.; Jaramillo-Colorado, B.; Stashenko, E.E. Actividad repelente de los aceites esenciales de *Lippia origanoides*, *Citrus sinensis* y *Cymbopogon nardus* cultivadas en Colombia frente a *Tribolium castaneum*, Herbst. **Salud UIS**, 41: 244-250, 2009.
211. Olivero-Verbel, J.; González-Cervera, T. Güette-Fernandez, J. Jaramillo-Colorado, B. Stashenko, E. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils isolated from colombian plants. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 20: 568-574, 2010.
212. Ortega-Nieblas, M.M.; Robles-Burgueño, M.R.; Acedo-Félix² E.; González-León, A.; Morales-Trejo A.; Vázquez-Moreno, Luz. Chemical composition and antimicrobial activity of oregano (*Lippia palmeri* S. Wats) essential oil. **Revista Fitotecnia Mexicana**, 34: 11-17, 2011.

- 213.Oskay, M.; M.; Tamer, A.U.; Ay, G.; Sari, D.; Aktas, K. Antimicrobial activity of the leaves of *Lippia triphylla* (L'Her) O. Kuntze (Verbenaceae) against bacteria and yeasts. **Journal of Biological Sciences**, 5: 620-622, 2005.
- 214.Oyourou, J.; Combrinck, S.; Regnier, T.; Marston, A. Purification, stability and antifungal activity of verbascoside from *Lippia javanica* and *Lantana camara* leaf extracts. **Industrial Crops and Products**, 43: 820-826, 2013.
- 215.Pankey, G.A. and Sabath, L.D. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. **Clinical Infectious Diseases**, 38:864-70, 2004.
- 216.Park, M. J.; Gwak, K. S.; Yang, I.; Kim, K. W.; Jeung, E. B.; Chang, J. W.; Choi, I. G. Effect of citral, eugenol, nerolidol and α -terpineol on the ultrastructural changes of Trichophyton mentagrophytes. **Fitoterapia**, 80: 290-296, 2009.
- 217.Pascual, M.E.; Slowing, K.; Carretero, E.; Mata, D. S.; Villar, A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, 76: 201-214, 2001.
- 218.Pavela, R. Larvicidal property of essential oils against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). **Industrial Crops and Products**, 30: 311- 315, 2009.
- 219.Pedrajas, J.R., Miranda-Vizuet, A., Javanmardy, N., Gustafsson, J-Å., Spyrou, G. Mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* contain one-conserved cysteine type peroxiredoxin with thioredoxin peroxidase activity. **The Journal of Biological Chemistry**, 275: 16296-16301, 2000.
- 220.Paulus, D.; Valmorbid, R; Toffoli, E; Nava. G.A. Teor e composição química de óleo essencial de cidró em função da sazonalidade e horário de colheita. **Horticultura Brasileira**, 31: 203-209, 2013.
- 221.Peixoto, M. G.; Costa-Júnior, L. M.; Blank, A. F.; Lima, A.S.; Menezes, T. S. A.; Santos, D. A.; Alves, P. B.; Cavalcanti, S. C. H.; Bacci, L.; Arrigoni-Blank, M. F. Acaricidal activity of essential oils from *Lippia alba* genotypes and its major components carvone, limonene, and citral against *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, 210: 118-122, 2015.
- 222.Perea, S. and Patterson, T.F. Antifungal resistance in pathogenic fungi. **Antimicrobial Resistance**, 35: 1073-1080, 2002.
- 223.Perricone, M.; Arace, E.; Corbo, M.R.; Sinigaglia, M.; Bevilacqua, A. Bioactivity of essential oils: a review on their interaction with food components. **Frontiers in Microbiology**, 6: 1-7, 2015.
- 224.Pessoa, L.M.; Morais, S.M.; Bevilacqua, C.M.L.; Luciano, J.H.S. Anthelmintic activity of

- essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. and eugenol against *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, 109: 59-63, 2002.
225. Pessoa, O.D.L.; Carvalho, C.B.M.; Silvestre, J.O.V.L.; Lima, M.C.L.; Neto, R.M.; Matos, F.J.A.; Lemos, T.L.G. Antibacterial activity of the essential oil from *Lippia aff. gracillis*. **Fitoterapia**, 76: 712-714, 2005.
226. Phyllipson, J. D. Phytochemistry and Medicinal Plants. **Phytochemistry**. 56: 237-243, 2001.
227. Pichersky, E.; Gershenzon, J. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. **Current Opinion in Plant Biology**, 5: 237-243, 2002.
228. Pinto, C.P.; Rodrigues, V.D.; Pinto, F.P.; Pinto, R.P.; Uetanabaro, A.P.T.; Pinheiro, C.S.R.; Gadea, S.F.M.; Silva, T.R.S.; Lucchese, A.M. Antimicrobial activity of *Lippia* species from the Brazilian semiarid region traditionally used as antiseptic and anti-infective agents. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2013: 1-5, 2013.
229. Pinto, J.A.; Ortega, L.A.G.; Rosado, P.A.; Rodrigues, J.M., Baluja, R. Composición y propiedades antibacterianas del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. **Revista Cubana de Farmácia**, 30: 29-35, 1996.
230. Pulido, A. and Beristain, C.I. Encapsulación de ácido ascórbico mediante secado por aspersión, utilizando quitosano como material de pared. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, 9: 189-195, 2010.
231. Quintanilla-Licea, R.; Mata-Cárdenas, B. D.; Vargas-Villarreal, J.; Bazaldúa-Rodríguez, A.F.; Ángeles-Hernández, I. K.; Garza-González, J. N.; Hernández-García, M. E. Antiprotozoal activity against *Entamoeba histolytica* of plants used in northeast Mexican traditional medicine. Bioactive compounds from *Lippia graveolens* and *Ruta chalepensis*. **Molecules**, 19: 21044-21065, 2014.
232. Quirantes-Piné, R.; Herranz-López, M.; Funes, L.; Borrás-Linares, I.; Micol, V.; Segura-Carretero, A. Fernández-Gutiérrez, A phenylpropanoids and their metabolites are the major compounds responsible for blood-cell protection against oxidative stress after administration of *Lippia citriodora* in rats. **Phytomedicine**, 12: 1112-1118, 2013.
233. Radulović, N.S.; Mladenović, M.Z.; Randjelovic, P.J.; Stojanović, N.M.; Dekić, M.S.; Blagojević, P.D. Toxic essential oils. Part IV: The essential oil of *Achillea falcata* L. as a source of biologically/pharmacologically active trans-sabinyl esters. **Food and Chemical Toxicology**, 80: 114-129, 2015.
234. Ramalho, V.C e Jorge, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, 29: 755-760, 2006.

- 235.Ramos, A.; Visozo, A.; Piloto, J.; Garcia, C.A.; Rodriguez, A.; Rivero, R. Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in Cuban medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, 87: 241-246, 2003.
- 236.Regnier, T.; Plooy, W.; Combrink, S.; Botha, B. Fungitoxicity of *Lippia scaberrima* essential oil and select terpenoid components on two mango postharvest spoilage pathogens. **Biology and Technology**, 48: 254-258, 2008.
- 237.Regnier, T.; Combrinck, S.; Plooy, W.; Botha, B. Evaluation of *Lippia scaberrima* essential oil and some pure terpenoid constituents as postharvest mycobiocides for avocado fruit. **Biology and Technology**, 57: 176-182, 2010.
- 238.Reis, F.B.; Souza, V.M.; Thomaz, M.R.S.; Fernandes, L.P.; Oliveira, W.P.; Martinis, E.C.P. Use of *Carnobacterium maltaromaticum* cultures and hydroalcoholic extract of *Lippia sidoides* Cham. against *Listeria monocytogenes* in fish model systems. **International Journal of Food Microbiology**, 146: 228-234, 2011.
- 239.Ribeiro, A.F., Andrade, E.H.A., Salimena, F.R.G., Maia, J.G.S. Circadian and seasonal study of the cinnamate chemotype from *Lippia origanoides* Kunth. **Biochemical Systematics and Ecology**, 55: 249-259, 2014.
- 240.Ribeiro, M.L.; Priolli, D.G.; Miranda, D.D.C Paiva, D.A.; Pedrazzoli Júnior, J.; Martinez, C.A.R. Evaluation of dna oxidative damage in normal and neoplastic cells of colonic mucosa in patients with colorectal cancer. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, 27: 391-402, 2007.
- 241.Ribeiro, S.M.R.; Queiroz, J.H.; Peluzo, M.C.G.; Costa N.M.B.; Matta, S.L.P.; Queiroz, M.E.L.R. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, 21: 133-149, 2005.
- 242.Rivas, L.; McDonnell, M. J.; Burgess, C. M.; O'Brien, M.; Navarro-Villa, A.; Fanning, S.; Duffy, G. Inhibition of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in model broth and rumen systems by carvacrol and thymol. **International Journal of Food Microbiology**, 139: 70-78, 2010.
- 243.Riordan, M. Rylance, G. Berry, K. Poisoning in children 4: household products, plants, and mushrooms. **Archives of Disease in Childhood**, 87: 403-406, 2002.
- 244.Roby, M.H.H.; Sarhan, M.A.; Selim, K.A-H.; Khalel, K.I. Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). **Industrial Crops and Products**, 44: 437-445, 2013.
- 245.Rocha-Guzmán, N.E., Infante, J.A.; Laredo, R.F.; Gomes, M.; Camacho, R.; Uribe, A.; Rosales, M.R. Antioxidant effect of oregano (*Lippia berlandieri* v. Shauer) essential oil and mother liquors. **Food Chemistry**, 102: 330-335, 2007.

- 246.Sánchez, D.O.S.; Najera, G.L.A.; Rivera, I.L.; Ramírez, O.D.; Cisneros, M.G.V.; García, V.M.N. Antimicrobial activity of medicinal plants from the Huautla sierra biosphere reserve in Morelos (México). **Polibotanica**, 28: 213-225, 2009.
- 247.Sánchez, R. A. S.; Portillo-Ruiz, M. C.; Viramontes-Ramos,S.; Muñoz-Castellanos. L. N.; Nevárez-Moorillón, G. V. Effect of Mexican oregano (*Lippia Berlandieri* Schauer) essential oil fractions on the growth of *Aspergillus* spp. in a bread model system. **Journal of Food Processing and Preservation**, 1-8, 2014.
- 248.Santos, A. S.; Alves, S. M.; Figueiredo, F. J. C.; Neto, O. G. R. Comunicado técnico. Descrição de sistema e de métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2004.
- 249.Santos, F.A.; Rao, V.S.N. 1,8- Cineol, a food flavoring agent, prevents ethanol-induced gastric injury in rats. **Digestive Diseases and Sciences**, 46: 331-337, 2001.
- 250.Santos, F.A.; Rao, V.S.N.; Silveira, E. R. Investigations on the antinociceptive effect of *Psidium guajava* leaf essential oil and its major constituents. **Phytotherapy Research**, 12: 24-27, 1998.
- 251.Santos, J.S.; Melo, J.I.M.; Abreu, M.C.; Sales, M.F. Verbenaceae *sensu stricto* na região de Xingó: Alagoas e Sergipe, Brasil. **Rodriguésia**, 60: 985-998, 2009.
- 252.Sarrazin, S.L.F.; Oliveira, R.B.; Barata, L.E.S.; Mourão, R.H.V. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Lippia grandis* Schauer (Verbenaceae) from the western Amazon. **Food Chemistry**, 134: 1474-1478, 2012.
- 253.Sarrazin, S.L.F.; Silva, L.A.; Assunção, A.P.F.; Oliveira, R.B.; Calao, V.Y.P.; Silva, R. Stashenko, E.E.; Maia, J.G.S.; Mourão, R.H.V. Antimicrobial and seasonal evaluation of the carvacrol-chemotype oil from *Lippia origanoides* Kunth. **Molecules**, 20: 1860-1871, 2015.
- 254.Scherer, R.; Godoy, H.T. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. **Food Chemistry**, 112: 654-658, 2009.
- 255.Schrader, M.; Fahimi, H.D. Peroxisomes and oxidative stress. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1763: 1755-1766, 2006.
- 256.Semen, E.; Hiziroglu, S.; Production, yield and derivatives of volatile oils from Eastern Redcedar (*Juniperus virginiana* L.). **American Journal of Environmental Sciences**, 1: 133-138, 2005.
- 257.Senatore, F. Influence of harvesting time on yield and composition of the essential oil of a thyme (*Thymus pulegioides* L.) growing wild in Campania (Southern Italy). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 44: 1327-1332, 1996.

- 258.Senthilkumar, A. e Venkatesalu, V. Chemical constituents, in vitro antioxidant and antimicrobial activities of essential oil from the fruit pulp of wood apple. **Industrial Crops and Products**, 46: 66-72, 2013.
- 259.Servat, L.; Spindola, H.M.; Rodrigues, R.A.F.; Foglio, M.A. Microencapsulação: uma alternativa promissora para preservação de produtos naturais. **Fitos**, 5: 52-57, 2010.
- 260.Shikanga, E.A.; Combrinck, S.; Regnier, T. South African *Lippia* herbal infusions: Total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities. **South African Journal of Botany**, 76: 567-571, 2010.
- 261.Shinohara, N.K.S.; Barros, V.B.; Jimenez, S.M.C.; Machado, E.C.L.; Dutra, R.A.F.; Filho, J.L.L. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência & Saúde Coletiva**, 13:1675-1683, 2008.
- 262.Shukla, R.; Kumar, A.; Singh, P.; Dubey, N.K. Efficacy of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown essential oil and its monoterpene aldehyde constituents against fungi isolated from some edible legume seeds and aflatoxin B1 production. **International Journal of Food Microbiology**, 135: 165-170, 2009.
- 263.Sies, H. Glutathione and its role in cellular functions. **Free Radical Biology & Medicine**, 27: 916-921, 1999.
- 264.Sies, H.; Stahl, W. Vitamins E and C, α -carotene, and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**, 62: 1315-1321, 1995.
- 265.Sikkema, J.; De Bont, J. A. M.; Poolman, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiological Reviews**, 59: 201-222, 1995.
- 266.Silva, F.; Ferreira, S.; Duarte, A.; Mendon, D.I. Domingues, F.C. Antifungal activity of *Coriandrum sativum* essential oil, its mode of action against *Candida* species and potential synergism with amphotericin B. **Phytomedicine**, 19: 42-47, 2011.
- 267.Silva, J.; Abebe, W.; Sousa, S. M.; Duarte, V. G.; Machadoc, M. I. L.; Matos, F. J. A. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. **Journal of Ethnopharmacology**, 89: 277-283, 2003.
- 268.Silva, J.P.L.; Duarte-Almeida, J.M.; Perez, D.V.; Franco, B.D.G.M. Óleo essencial de orégano: interferência da composição química na atividade frente à *Salmonella enteritidis*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 30: 136-141, 2010c.
- 269.Silva, N.A.; Da Silva, J.K.; Andrade, E.H.; Carreira, L.M.; Sousa, P.J.; Maia, J.G. Essential oil composition and antioxidant capacity of *Lippia schomburgkiana*. **Natural Products Communication**, 4: 1281-1286, 2009.
- 270.Silva, N.C.C.; Fernandes Júnior, A. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including**

- Tropical Diseases**, 16: 402-413, 2010a.
- 271.Silva, V.A.; Freitas, A.F.R.; Pereira, M.S.V.; Siqueira Júnior, J.P.; Pereira, A.V.; Higino, J.S. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana do extrato da *Lippia sidoides* Cham. sobre isolados biológicos de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 12: 452-455, 2010b.
- 272.Silveira, G.P.; Nome, F.; Gesser, J.C.; Sá, M.M.; Terenzi, H. Estratégias utilizadas no combate à resistência bacteriana. **Química Nova**, 29: 844-855, 2006.
- 273.Simões, C. M. O.; Mentz, L. A.; Schenkel, E. P.; Irgang, B. E.; Stehmann, J. R. Plantas da Medicina Popular no Rio Grande do Sul. 50 ed. Porto Alegre, RS: UFRGS, 1998.
- 274.Simões, C. M. O.; Spitzer, V. Farmacognosia: da Planta ao Medicamento - Óleos Voláteis. Editora: Universidade/UFRGS/ Ed. da UFSC, Porto Alegre, RS/Florianópolis/SC, 2007.
- 275.Simons, J.F.; Ferro-Novick, S.; Rose, M.D., Helenius, A. BiP/Kar2p serves as a molecular chaperone during carboxypeptidase Y folding in yeast. **The Journal of Cell Biology**, 130: 41-49, 1995.
- 276.Singh, P.; Mishra, G.; Jha, K.K.; Garg, V.K.; Khosa, R. L. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of leaves of *Vitex negundo* Linn. (Verbenaceae). **International Journal of ChemTech Research**, 2: 1686-1690, 2010.
- 277.Siqueira-Lima, P.S.; Araújo, A.S.; Lucchese, A. M.; Quintans, J.S.S.; Menezes, P.P.; Alves, P.B.; de Lucca Júnior, W.; Santos, M.R.V.; Bonjardim, L. R.; Quintans-Júnior, L.J. β -cyclodextrin complex containing *Lippia grata* leaf essential oil reduces orofacial nociception in mice - evidence of possible involvement of descending inhibitory pain modulation pathway. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, 114: 188-96, 2014.
- 278.Sivira, A.; Sanabria, M.E.; Valera, N.; Vásquez, C. Toxicity of ethanolic extracts from *Lippia organoides* and *Gliricidia sepium* to *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval) (Acari: Tetranychidae). **Neotropical Entomology**, 40: 375-379, 2011.
- 279.Souza Brito, A.R.M.; Souza Brito, A.A. Forty years of Brazilian medicinal plant research. **Journal of Ethnopharmacology**, 39: 53-67, 1993.
- 280.Souza, V.C.; Lorenzi, H. Verbenaceae. Botânica sistemática. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, Nova Odessa, pp. 529-532, 2005. In: Santos, J. S.; Melo, J. I. M.; Abreu, M.C.; Sales, M.F. Verbenaceae *sensu stricto* na região de Xingó: Alagoas e Sergipe, Brasil. **Rodriguésia**, 60: 985-998, 2009.
- 281.Stashenko, E.E.; Jaramillo, B.E.; Martínez, J.R. Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante *in vitro* de los metabolitos secundarios volátiles de plantas

- de la familia Verbenaceae. **Revista de la Academia Colombiana de Ciencias**. 27: 579-597, 2003.
282. Stashenko, E.E.; Martínez, J.R.; Ruíz, C. A.; Arias, G.; Durán, C.; Salgar, W.; Cala, M. *Lippia origanoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. **Journal of Separation Science**, 33: 93-103, 2010.
283. Stephen, D.W.S. and Jamieson, D.J. Amino acid-dependent regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* GSH1 gene by hydrogen peroxide. **Molecular Microbiology**, 23: 203-210, 1997.
284. Stohs, S.J. and Bagchi, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. **Free Radical Biology & Medicine**, 18: 321-336, 1995.
285. Suarez, A.G., Castillo, G. and Chacón, S. Genetic diversity and spatial genetic structure within a population of an aromatic shrub, *Lippia origanoides* (Verbenaceae), in the Chicamocha Canyon, northeastern Colombia. **Genetic Research**, 90: 455-465, 2008.
286. Sudhaus, N.; Nagengast, H.; Pina-Pérez, M.C; Martínez, A.; Klein, G. Effectiveness of a peracetic acid-based disinfectant against spores of *Bacillus cereus* under different environmental conditions. **Food Control**, 39: 1-7, 2014.
287. Suizu, H.; Tsutsumi, Y.O.; Kawad, A.; Imayasu, S.; Kimura, A.; Murata, K. Absolute glutathione requirement for sporulation of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 205: 1151-1155, 1994.
288. Sullivan, D.J.; Moran, G.P.; Pinjon, E.; Al-Mosaid, A.; Stokes, C.; Vaughan, C.; Coleman, D.C. Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. **FEMS Yeast Research**, 4: 369-376, 2004.
289. Sutili, F.J.; Cunha, M. A.; Ziech, R. E.; Krewer, C. C.; Zeppenfeld, C. C.; Heldwein, C. G.; Gressler, L. T.; Heinzmann, B. M.; Vargas, A. C.; Baldisserotto, B. *Lippia alba* essential oil promotes survival of silver catfish (*Rhamdia quelen*) infected with *Aeromonas* sp. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 87: 95-100, 2015.
290. Sylvestre, M.; Pichette, A.; Longtin, A.; Nagaub, F.; Legault, J. Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. **Journal of Ethnopharmacology**, 103: 99-102, 2006.
291. Tajik, J.; Kheirandish, R.; Amanollahi, R.; Shahabi, A. Gastroprotective effect of aqueous extracts of *Lippia citriodora*, ajowan (*Trachyspermum copticum*), and *Dracocephalum polychaetum* on induced gastric ulcer in rats. **Comparative Clinical Pathology**, 2015.
292. Tangarife-Castaño, V.; Correa-Royero, J.; Zapata-Londoño, B.; Camilo-Durán;

- Stashenko, E.; Mesa-Arango, A.C. Anti-*Candida albicans* activity, cytotoxicity and interaction with antifungal drugs of essential oils and extracts from aromatic and medicinal plants. **Infectio**, 15: 160-167, 2011.
293. Tarun, G.; Onkar, S.; Saahil, A.; R.S.R, M. Patented microencapsulation techniques and its application. **Journal of Pharmacy Research**, 4: 2097-2102, 2011.
294. Tatsadjieu, N.L.; Jazet, D.O.M.; Ngassoum, M.B.; Etoa, F.X.; Mbofung, C.M.F. Investigations on the essential oil of *Lippia rugosa* from Cameroon for its potential use as antifungal agent against *Aspergillus flavus* Link ex. Fries. **Food Control**, 20: 161-166, 2009.
295. Tavares, E.S.; Julião, L. S.; Lopes, D.; Bizzo, H.R.; Lage, C.L.S.; Leitão, S. G. Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 15: 1-5, 2005.
296. Teixeira, B.; Marques, A.; Ramos, C.; Neng, N.R.; Nogueira, J.M.F.; Saraiva, J.A.; Nunes, M.L. Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. **Industrial Crops and Products**, 43: 587-595, 2013.
297. Tenover, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **The American Journal of Medicine**, 119: 3-10, 2006.
298. Teodoro, R.A.R.; Fernandes, R.V.B.; Botrel, D.A.; Borges, S.V.; Souza, A.U. Characterization of microencapsulated rosemary essential oil and its antimicrobial effect on fresh dough. **Food and Bioprocess Technology**, 7: 2560-2569, 2014.
299. Tholl, T. Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. **Current Opinion in Plant Biology**, 9:1-8, 2006.
300. Tonon, R.V.; Grosso, C.R.F.; Hubinger, M.D. Influence of emulsion composition and inlet air temperature on the microencapsulation of flaxseed oil by spray drying. **Food Research International**, 44; 282-289, 2011.
301. Trombetta, D.; Castelli, F.; Sarpietro, M. G.; Venuti, V.; Cristani, M. T.; Daniele, C.; Saija, A.; Mazzanti, G.; Bisignano, G. Mechanisms of antibacterial action of three Monoterpenes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 49: 2474-2478, 2005.
302. Turgis, M.; Han, J.; Caillet, S.; Lacroix, M. Antimicrobial activity of mustard essential oil against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhi*. **Food Control**, 20:1073-1079. 2009.
303. Turkoglu, A.; Duru, M.E. Mercan, N.; Kivrak, I.; Gezer, K. Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. **Food Chemistry**, 101: 267-273, 2007.

304. Valentin, A.; Pelissier, Y.; Benoit, F.; Marion, C.; Kone, D.; Mallie, M.; Bastide, J.M.; Bessieres, J.M. Composition and antimalarial activity in vitro of volatile components of *Lippia multiflora*. **Phytochemistry**, 40: 1439-1442, 1995.
305. Valko, M.; Rhodes, C.J.; Moncola, J.; Izakovic, M.; Mazura, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, 160: 1-40, 2006.
306. Varona, S.; Kareth, S.; Martín, A.; Cocero, M.J. Formulation of lavandin essential oil with biopolymers by PGSS for application as biocide in ecological agriculture. **The Journal of Supercritical Fluids**, 54: 369-377, 2010.
307. Vega-Vela, N.E. & Sánchez, M.I.C. Genetic structure along an altitudinal gradient in *Lippia origanoides*, a promising aromatic plant species restricted to semiarid areas in northern South America. **Ecology and Evolution**, 2: 2669-2681, 2012.
308. Veras, H. N. H.; Rodrigues, F. F. G.; Botelho, M. A.; Menezes, I. R. A.; Coutinho, H.D.M.; Costa, J. G. M. Antimicrobial effect of *Lippia sidoides* and thymol on *Enterococcus faecalis* biofilm of the bacterium isolated from root canals. **Hindawi Publishing Corporation**, 2014: 1-5, 2014.
309. Vicuña, G.C.; Stashenko, E.E.; Fuentes, J.L. Chemical composition of the *Lippia origanoides* essential oils and their antigenotoxicity against bleomycin-induced DNA damage. **Fitoterapia**, 81: 343-349, 2010.
310. Wang, J., Pareja, K.A., Kaiser, C.A., Sevier, C.S. Redox signaling via the molecular chaperone BiP protects cells against endoplasmic reticulum-derived oxidative stress. **eLife**, 3: e03496, 2014.
311. Wanke, M.; Skorupinska-Tudek, K.; Swiezewska, E. Isoprenoid biosynthesis via 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate/2-Cmethyl- D-erythritol 4-phosphate (DOXP/MEP) pathway. **Acta Biochimica Polonica**, 48: 663-672, 2001.
312. Wemmie, J.A.; Szczypka, M.S.; Thiele, D.J.; Moye-Rowley, W.S. Cadmium tolerance mediated by the yeast AP-1 Protein requires the presence of an ATP-binding cassette transporter-encoding gene, *YCF1*. **The Journal of Biological Chemistry**, 269: 32592-32597, 1994.
313. White, D.G.; Zhao, S.; Simjee, S, Wagenr, D.D.; McDermott. P.F. Antimicrobial resistance of foodborne pathogens. **Microbes and Infections**, 4: 405-412, 2002.
314. White, T.C.; Marr, K.A and Bowden, R.A. Contribute to antifungal drug resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, 11: 382-402, 1998.
315. WHO. Traditional Medicine, Growing Needs and Potential. Policy Perspectives on 83 Medicines n° 2, Geneva, 2002. Disponível em:

<http://whqlibdoc.who.int/hq/2002/HWO_EDM_2002.4.pdf>. Acessado em 17 de março de 2013.

316. Willcox, J.K.; Ash, S.L. & Catignani, G.L. Antioxidants and prevention of chronic disease. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 44: 275-295, 2004.
317. Witztum, J.S. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. **The Lancet**, 344: 793-795, 1994.
318. Wysocki, R. and Tamas, M.J. How *Saccharomyces cerevisiae* copes with toxic metals and metalloids. **FEMS Microbiology Reviews**, 34: 925-951, 2010.
319. Xiao, Z.; Liu, W.; Zhu, G.; Zhor, R.; Niu, Y. A review of the preparation and application of flavour and essential oils microcapsules based on complex coacervation technology. **Journal of the Science Food and Agriculture**, 94: 1482-1494, 2014.
320. Yibar, A, Cetinkaya, F.; Soyutemiz, G.E. Detection of rope-producing *Bacillus* in bread and identification of isolates to species level by Vitek 2 System. **Journal of Biological and Environmental Sciences**, 6: 243-248, 2012.
321. Zeni, A.L.B.; Albuquerque, C.A.C.; Gonçalves, F.; Latini, A.; Tasca, C.; Podestá, R.; Pagliosa, C.M.; Duarte, F.S.; Lima, T.C.M. Maraschin, M. Phytochemical profile, toxicity and antioxidant activity of *Aloysia gratíssima* (Verbenaceae). **Química Nova**, 36: 69-73, 2013.
322. Zhao, J.; Li, Y.; Liu, Q.; Gao, K. Antimicrobial activities of some thymol derivatives from the roots of *Inula hupehensis*. **Food Chemistry**, 120: 512-516, 2010.

LISTA DE PUBLICAÇÕES

SARRAZIN, SANDRA LAYSE F.; DA SILVA, LEOMARA A.; OLIVEIRA, RICARDO B.; RAPOSO, JULIANA DIVINA A.; DA SILVA, JOYCE KELLY R.; SALIMENA, FÁTIMA REGINA G.; MAIA, JOSÉ GUILHERME S.; MOURÃO, ROSA HELENA V. Antibacterial action against food-borne microorganisms and antioxidant activity of carvacrol-rich oil from *Lippia origanoides* Kunth. *Lipids in Health and Disease*, v. 14, p. 145, 2015.

SARRAZIN, SANDRA; DA SILVA, LEOMARA; DE ASSUNÇÃO, ANA; OLIVEIRA, RICARDO; CALAO, VICTOR; SILVA, RODRIGO; STASHENKO, ELENA; MAIA, JOSÉ; MOURÃO, ROSA. Antimicrobial and Seasonal Evaluation of the Carvacrol-Chemotype Oil from *Lippia origanoides* Kunth.. *Molecules (Basel. Online)*, v. 20, p. 1860-1871, 2015.

CAPÍTULO II

***Composição química, atividades antioxidante e antimicrobiana do óleo essencial de *Lippia origanoides* Kunth (Verbenaceae), contra microorganismos patogênicos contaminantes de alimentos**

Sandra Layse F. Sarrazin¹, Leomara A. da Silva², Ricardo B. Oliveira², Juliana Divina A. Raposo³, Joyce Kelly R. da Silva³, Fátima Regina G. Salimena⁴, José Guilherme S. Maia^{2,3}, Rosa Helena V. Mourão^{1,2}

Resumo

Introdução: *Lippia origanoides* Kunth do Norte do Brasil é uma planta de odor agradável, usada pela população local como um tempero de alimentos e como antisséptico para boca e feridas e irritação de garganta. Seu óleo rico em carvacrol mostrou atividade antimicrobiana significativa contra patógenos humanos.

Métodos: A composição química do óleo essencial foi analisada por CG e CG-EM e sua atividade antibacteriana foi avaliada pelos métodos de disco-difusão em agar e microdiluição em caldo. A determinação da atividade antioxidante foi efetuada por ensaio de sequestro de radicais DPPH e auto-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico.

Resultados: Os constituintes principais do óleo foram carvacrol (47,2%), timol (12,8%), p -cimeno (9,7%), e p -metoxitimol (7,4%). O óleo foi ativo frente à *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, e *Salmonella typhimurium*, não exercendo nenhuma atividade frente à *Pseudomonas aeruginosa*. A atividade antioxidante apresentou elevada dose-resposta ($r^2 = 0,92$), com redução do radical DPPH de 15% a 82%, em concentrações variando entre 5 a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e elevada inibição da oxidação do β -caroteno de $85,2 \pm 6,8\%$, o que corresponde a aproximadamente 80% da inibição do padrão Trolox ($93,4 \pm 0,7\%$). A DL_{50} foi determinada em 1.673,84 mg Kg^{-1} .

Conclusão: O óleo essencial de *L. origanoides* é rico em compostos biativos capazes de inibir o crescimento de microorganismos patogênicos contaminantes de alimentos, bem como retardar o processo de oxidação. Apresenta ainda baixa toxicidade, possibilitando sua aplicação na indústria de alimentos.

Palavras-chave: *Lippia origanoides*, atividade antioxidante, ação antimicrobiana, óleo essencial, composição química, carvacrol e timol.

Abstract

Background: *Lippia origanoides* Kunth from Northeast Brazil is a plant of pleasant odor used by local people as a food seasoning in substitution the oregano where its carvacrol-rich oil has showed significant antimicrobial activity against human pathogens.

Methods: GC and GC-MS analyzed the plant oil composition and its antibacterial activity was evaluated by disk diffusion and microdilution broth methods. The determination of oil antioxidant activity was made by DPPH radical scavenging assay. Oil toxicity was performed on mice.

Results: The main constituents of the oil were carvacrol (47.2 %), thymol (12.8 %), *p*-cymene (9.7 %), and *p*-methoxythymol (7.4 %). The oil was active against the bacteria of *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, and *Salmonella typhimurium*, except for *Pseudomonas aeruginosa*. The antioxidant activity has displayed a high dose–response ($r^2 = 0.92$), with the inhibition of DPPH radical from 15 to 82 %, at concentrations from 5 to 50 $\mu\text{g/mL}$, and also by the β -carotene bleaching assay, which showed a high inhibition of 85.2 ± 6.8 %, corresponding to about 80 % of the inhibition of Trolox (93.4 ± 0.7 %), used as a standard. The lethal dose (LD_{50}) of the oil was determined in $1673.84 \text{ mg Kg}^{-1}$.

Conclusion: The results confirmed that the oil of *L. origanoides* could be utilized for the prevention of food bacterial growth, and as an antioxidative agent for retardation of food oxidation process. The oil has low toxicity, allowing its application in the food industry.

Keywords: *Lippia origanoides*, antioxidant and antibacterial activity, toxicity, essential oil composition, carvacrol and thymol.

*Versão em português do artigo publicado na revista *Lipids in Health and Disease*-**DOI:** 10.1186/s12944-015-0146-7. Parte da Tese de Doutorado da primeira autora, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da rede BIONORTE. ¹ Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal, Universidade Federal do Amazonas, 60077-000 Manaus, AM, Brasil. ² Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia, Universidade Federal do Oeste do Pará, 68135-110, Santarém, PA, Brasil. ³ Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Pará, 66075-110, Belém, PA, Brasil. ⁴ Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 36036-330, MG, Brasil.

1. Introdução

Embora tenham sido desenvolvidas técnicas modernas de produção e conservação de alimentos (alta pressão hidrostática, pulsos eletromagnéticos, embalagens bioativas ou sistemas de atmosfera modificada), a segurança alimentar permanece uma importante questão de saúde pública e econômica para a sociedade humana [1]. O crescimento de bactérias e fungos patogênicos sobre alimentos pode afetar sua preservação, desencadeando doenças de origem alimentar emergentes em diferentes regiões do mundo. Esta situação é particularmente relevante devido ao aumento da resistência aos agentes antimicrobianos atualmente utilizados na conservação de alimentos.

Adicionalmente, a oxidação de lipídios em produtos alimentares pode resultar no surgimento de ranço e deterioração, afetando sua qualidade nutritiva e dando origem a produtos de oxidação potencialmente tóxicos, não aceitáveis para o consumo humano [2]. O uso de conservantes químicos tem sido a abordagem convencional para melhorar a segurança alimentar e reduzir os riscos do processo de oxidação. No entanto, partes dos resíduos deixados por estes conservantes têm demonstrado algum grau de toxicidade [3]. Estes resultados, juntamente com o interesse do consumidor em aditivos alimentares naturais têm reforçado a busca por antioxidantes de origem natural [4]. Neste contexto, a utilização de óleos essenciais como antioxidantes naturais tornou-se um campo promissor de investigação e potencial utilização, após a suspeita de que os antioxidantes sintéticos tais como butil-hidroxi-anisol (BHA) e butil-hidroxi-tolueno (BHT) representem potencial risco para a saúde humana [5].

Espiciarias tem mostrado uma diversidade de constituintes voláteis com propriedades bioativas e, entre estes, muitos com atividade antioxidante significativa, além do uso comprovado contra os potenciais microorganismos deteriorantes de alimentos [6]. Por exemplo, o gênero *Lippia* (Verbenaceae), amplamente distribuído na América do Sul, África Tropical e Central, compreende muitas espécies utilizadas como tempero em diferentes preparações de alimentos [7]. *Lippia organoides* Kunth, conhecida na Região Norte do Brasil como "salvia-de-Marajó", é uma planta de odor agradável, usada pela população local como tempero de alimentos em substituição ao orégano. Espécimes de *L. organoides* com ocorrência natural em áreas do Baixo Amazonas, Brasil, são produtoras de óleos essenciais ricos em carvacrol, e seu potencial antimicrobiano contra patógenos humanos de importância clínica tem sido descrito [8,9].

No presente estudo, a eficácia do óleo essencial de *L. organoides* foi avaliada contra *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Salmonella typhimurium*,

frequentemente envolvidas no processo de deterioração de alimentos. Além disso, sua propriedade antioxidante foi determinada e seus constituintes voláteis foram analisados por CG e GC-EM. Em adição, sabendo que OE são constituídos por uma complexa mistura de substâncias químicas, é importante ressaltar que alguns de seus constituintes podem apresentar certo grau de toxicidade ao organismo. Assim, o presente estudo também avaliou a toxicidade oral aguda do óleo essencial de *L. origanoides*, por determinação da DL₅₀.

2. Material e métodos

2.1. Solventes e reagentes utilizados

Solventes (diclorometano e n-hexano), utilizados para a análise química do óleo essencial, foram fornecidos pela Merck (Rio de Janeiro, Brasil). Os meios de cultura foram obtidos da Himedia (Mumbai, Índia). Os reagentes (Tween 80 e resazurina, sulfato de sódio anidro, DPPH, β -caroteno e ácido linoleico) foram obtidos da Sigma-Aldrich e Sigma-Vetec (St. Louis, EUA e Rio de Janeiro, Brasil). Ampicilina (droga antimicrobiana padrão) foi obtida da Cefar (São Paulo, Brasil).

2.2. Material vegetal

Folhas e ramos finos (partes aéreas) de *L. origanoides* foram coletados em junho de 2012, em um campo experimental da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), Rodovia Everaldo Martins (PA-457), km 26, município de Santarém, Pará, Brasil. A posição geográfica da área amostrada foi determinada por GPS, resultando nas coordenadas 02 ° 30'870 " S e 54 ° 56'416 " W, a uma altitude de 52 m acima do nível do mar. As coletas foram realizadas pela manhã, entre 8 e 10 h. Exemplares testemunhos foram depositados no herbário da Universidade Federal de Juiz de Fora, cidade de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil, sob o número CESJ-64029.

2.3. Extração do óleo essencial

Folhas e ramos finos foram secos em temperatura ambiente e submetidos ao processo de hidrodestilação utilizando aparelho tipo Clevenger (100 g, 3 h). O óleo obtido foi seco com sulfato de sódio anidro, e o seu teor percentual foi calculado com base no peso seco

da planta. O teor de umidade das amostras foi calculado em balança de infravermelho. O procedimento foi realizado em triplicata.

2.4. Análise da composição química do óleo essencial

Análise química do óleo essencial foi efetuada em cromatógrafo gasoso (CG-EM - 6890 Plus Series) equipado com detector seletivo de massa (Agilent, MSD 5973) e um amostrador automático (Agilent, 7863), sob as seguintes condições: DB-5 ms (60 m x 0,25 mm; espessura da película = 0,25 mm) coluna capilar de sílica fundida; temperatura programada em 50 °C (5 min. em modo isotérmico), 150 °C (4 °C min⁻¹ + 2 min. em modo isotérmico), 250 °C (5 °C min⁻¹ + 5 min. em modo isotérmico), 275 °C (10 °C min⁻¹, mais 15 min. em modo isotérmico); temperatura do injetor à 250 °C, injeção tipo split (1 mL) e divisão de fluxo ajustado para uma razão de 30:1. Hélio foi utilizado como gás de arraste, com fluxo constante de 0,6 mL min⁻¹ e pressão de entrada de 16,5 psi. Os espectros de massa foram obtidos por impacto eletrônico a 70 eV de energia. As temperaturas da câmara de ionização e a linha de transferência foram mantidas a 230-285°C, respectivamente. Os dados quantitativos sobre os constituintes voláteis foram obtidos por normalização de área de pico, utilizando um CG 6890 Plus Series, acoplado ao detector FID, operado sob condições semelhantes do sistema de CG-EM. O índice de retenção foi calculado para todos os componentes voláteis, utilizando uma série homóloga de n-alcenos (C8-C32, Sigma-Aldrich). Os componentes individuais foram identificados por comparação de ambos os dados dos espectros de massas e índices de retenção de compostos autênticos, previamente analisados e armazenados em biblioteca particular, bem como com o auxílio de bibliotecas comerciais contendo índices de retenção e espectros de massas dos compostos voláteis comumente encontrados em óleos essenciais [10,11].

2.5. Ensaios de atividade antimicrobiana

2.5.1. *Microorganismos e condições de cultivo*

As cepas utilizadas nos ensaios antimicrobianos: *Salmonella typhimurium* (CCCD S004), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27953), *Bacillus cereus* (CCCD B001) e *Bacillus subtilis* CCCD (B005) foram adquiridas comercialmente na forma liofilizada. Os microorganismos foram hidratados em caldo nutriente (CN) a 37 ± 2 °C, durante 24 h. Os inóculos foram preparados através da inoculação direta de colônias em 1 mL de solução salina

estéril, e ajustados ao padrão 0,5 na escala de McFarland, correspondendo a $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ [12].

2.5.2. Método de disco-difusão em agar

A atividade antimicrobiana do óleo foi inicialmente avaliada pelo método padrão de disco-difusão em agar [12]. Ágar Mueller Hinton (MHA) foi usado como meio de crescimento para os microorganismos. Discos de papel filtro de 6 mm de diâmetro, contendo 10 µl de óleo não diluído, foram levemente pressionados contra a superfície do agar, previamente semeado com o microorganismo teste. Após 30 min. à temperatura ambiente, as culturas foram incubadas a 37 ± 2 °C, durante 24 h. No final do período de incubação, os diâmetros das zonas de inibição formados sobre o ágar foram mensurados em milímetros. Ampicilina (10 µg/disco) foi utilizada como padrão positivo. Os testes foram realizados em triplicata, e os valores obtidos foram comparados ao controle positivo.

2.5.3. Método de microdiluição em caldo - Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) [13]

Neste método, a concentração inicial de ensaio foi preparada por dissolução de 10 µl de óleo essencial em 1 mL de Tween 80 (1,0%). A partir desta solução estoque, concentrações de 0,07 a 5,0 µL mL⁻¹ foram igualmente preparadas por diluição em série (fator de diluição 1: 1) usando Mueller-Hinton (MHB) como diluente. O inóculo foi inicialmente ajustado ao padrão 0,5 da escala MacFarland, com posterior diluição (fator de diluição de 1:10, solução salina estéril), para obtenção da concentração final de $1,5 \times 10^4$ UFC mL⁻¹. Os testes foram realizados em placas de 96 poços, onde cada poço recebeu 90 µL da concentração específica de óleo, 90 µL de MHB estéril e 20 µL do inóculo. Ampicilina foi diluída em água destilada estéril para obtenção de concentrações variando de 0,1 a 46,9 µg mL⁻¹. O controle de crescimento microbiano, o controle de esterilidade do meio e o controle de atividade do solvente foram realizados simultaneamente. Cada poço comportou volume final de 200 µL. A inibição do crescimento de bactérias foi revelada após adição de solução aquosa de resazurina (20 µL, 0,02%, p/v) e re-incubação durante 3 h. A CIM, definida como a menor concentração de óleo essencial capaz de inibir o crescimento de microorganismos, foi determinada pela permanência de coloração azul nos poços. A mudança da cor azul para vermelho (devido à redução do corante) indicou o crescimento de células viáveis. Os poços que não mostraram crescimento aparente foram selecionados para avaliar a CBM, que foi

determinada pela ausência de crescimento microbiano sobre placas contendo MHA. Os testes foram realizados em triplicata.

2.6. Ensaio de atividade antioxidante

A atividade antioxidante do óleo essencial de *L. origanoides* foi avaliada pelos ensaios de sequestro de radicais DPPH e auto-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico, utilizando metodologias anteriormente descritas [14], com modificações.

No ensaio de sequestro de radicais DPPH, uma solução estoque do reagente DPPH foi diluída em metanol (aprox. 60 μ M - absorvância inicial de $0,62 \pm 0,02$ a 517 nm). A mistura reacional foi composta por 1950 μ L da solução de DPPH e 50 μ L de diferentes concentrações de óleo essencial previamente diluído em metanol. Trolox (ácido 2-carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano) foi utilizado como antioxidante padrão. Metanol, sem a adição do DPPH, foi utilizado como branco. A absorvância foi mensurada após 60 e 10 minutos de incubação das amostras e do Trolox, respectivamente. A atividade de sequestro do radical DPPH foi calculada pelo percentual de inibição de DPPH de acordo com a equação: $I = 100\% (AB) / A$, onde A e B representam os valores de absorvância da amostra e branco, no final da reação. A partir da análise de regressão linear determino-se a EC_{50} - concentração de antioxidante necessária para sequestrar 50% dos radicais DPPH. A análise foi efetuada em triplicata e os resultados apresentados como média \pm desvio padrão.

No ensaio de auto-oxidação do β -caroteno, uma solução estoque da mistura β -caroteno/ácido linoleico, foi preparada como se segue: 0,2 mg de β -caroteno foram dissolvidos em 1 mL de clorofórmio (grau HPLC), com posterior adição de 20 μ L de ácido linoleico e 265 μ L de Tween 40. O clorofórmio foi completamente removido usando evaporador a vácuo. Em seguida, 100 mL de água ultra-pura, saturada com oxigênio, foram adicionados à solução, sob agitação vigorosa. Alíquotas de 2.500 μ L desta solução foram distribuídas em tubos de ensaio e adicionadas de 200 μ L das amostras, inicialmente diluídas em etanol. O mesmo procedimento foi realizado com os padrões BHA, Trolox e branco (etanol).

A leitura de absorvância foi realizada em tempo zero (a 470 nm) e as emulsões incubadas em banho-maria a 50 °C. As leituras sequenciais foram monitoradas em intervalos de 15 min, em período total de 120 min. A atividade antioxidante (AA%) foi calculada em termos de percentual de inibição relativa ao controle, utilizando a seguinte equação: $AA\% = [A_0 - A_{120}] / [B_0 - B_{120}] \times 100$, onde A_0 , A_{120} , B_0 , e B_{120} são as absorvâncias da amostra e do controle no início e no fim da reação.

2.7. Toxicidade oral aguda - determinação da DL₅₀

A toxicidade oral aguda foi determinada em camundongos Swiss albinos, fêmeas, com idade aproximada de 2 meses e peso entre 35 e 47g. Os animais foram divididos em grupos (n=6 por grupo) e mantidos em jejum de 12 h, para posterior administração oral do óleo essencial em doses únicas variando entre 100 e 3.000 mg kg⁻¹. Os animais foram inicialmente observados por um período de 4 h, analisando os seguintes parâmetros fisiológicos ou comportamentais: agressividade, atividade motora, letargia, falta de apetite, secreção nasal, piloereção, micção, diarreia e convulsão. Após este período, os animais foram observados por um período adicional de 24, 48 e 72 h, seguidos de observação por um período total de 14 dias, para verificação de ocorrência de óbito. Os grupos controle negativo (água) e controle de ação do solvente (óleo mineral), foram analisados simultaneamente. A determinação da DL₅₀ foi calculada através da interpolação semi-logarítmica, sendo postos no eixo das ordenadas os valores dos probitos, correspondentes ao percentual de mortes e, no eixo das abcissas, as doses administradas. Durante o experimento, os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada (24 ±2 °C), ciclo claro/escuro de 12 h, com água e ração à vontade.

3. Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as diferenças entre as médias foram determinadas pelo teste de Tukey (p≤0,05), utilizando GraphPad Prism 5.0 e StatPlus 2009 como programas estatísticos.

4. Resultados e discussão

4.1. Composição química do óleo essencial

O rendimento do óleo de *L. origanoides* obtido por hidrodestilação foi de 1,3%. A composição química foi determinada por CG-EM, onde foram identificados trinta e três constituintes voláteis, representando 97,8% do total de compostos presentes neste óleo. Carvacrol (47,2%), timol (12,8%), *p*-cimeno (9,7%) e *p*-metoxitimol (7,4%) foram identificados como principais componentes. Os valores são expressos na Tabela 01.

Tabela 01 - Composição química do óleo essencial de *Lippia origanoides*.

Componentes	IR _{Calc.}	IR _{Lit.}	Óleo %
(Z)-Hexen-3-ol	854	859	0,2
α -Tujeno	926	924	0,6
α -Pinoeno	934	932	0,4
1-Octen-3-ol	976	974	0,1
Mirceno	990	988	1,1
α -Terpineno	1016	1014	0,5
ρ-Cimeno	1025	1020	9,7
Limoneno	1026	1024	0,2
1,8-Cineol	1032	1026	1,3
γ -Terpineno	1056	1054	0,2
Linalol	1098	1095	2,9
Umbellulona	1169	1167	0,3
Terpinen-4-ol	1176	1174	1,5
Timol metil eter	1234	1232	1,3
Isômero do timol/carvacrol (MW=150)	1282	-	0,4
Timol	1292	1289	12,8
Carvacrol	1299	1298	47,2
Timol acetato	1351	1349	0,4
Carvacrol acetato	1372	1370	0,6
Geranyl acetato	1382	1379	0,6
(E)-Cariofileno	1418	1416	2,3
<i>trans</i> - α -Bergamoteno	1434	1432	0,2
α -Humuleno	1455	1452	0,3
ρ-Metoxitimol	1487	1484	7,4
β -Bisaboleno	1506	1505	0,3
(Z)- α -Bisaboleno	1508	1506	0,2
ρ -Metoxicarvacrol (tent.)	1555	-	1,3
Óxido de cariofileno	1584	1582	1,6
2-feniletil tiglato	1587	1584	0,2
Epóxido de humuleno II	1611	1608	0,2
α -Eudesmol	1656	1653	0,1
α -Bisabolol	1686	1685	0,2
Sesquiterpenos não identificados			1,2
Total			97,8

IR_{Calc.} = Índice de Retenção calculado em coluna DB-5ms; IR_{Lit.} = Índice de Retenção da literatura (Adams, 2007).

A variação sazonal do óleo essencial de espécimes de *L. origanoides* com ocorrência no baixo Amazonas, mesma área de amostragem deste estudo, foi relatada recentemente [9]. Os principais constituintes encontrados foram carvacrol (estação chuvosa: 43,5%, estação seca: 41,4%), timol (estação chuvosa: 10,7%, estação seca: 10,6%), ρ -cimeno (estação chuvosa: 9,8%, estação seca: 10,0%) e ρ -metoxitimol (estação chuvosa: 9,6%, estação seca: 10,4%), portanto, com uma composição química semelhante.

Alguns quimiotipos do óleo de *L. origanoides* foram descritos. O óleo essencial obtido de folhas de três espécimes com ocorrência nas localidades de Cabeceiras, Campo

Maior e José de Freitas, Estado do Piauí, Brasil, mostrou composição semelhante, apresentando carvacrol como principal componente (43%) [15]. *Lippia schomburgkiana* Schauer, espécie sinónmia de *L. origanoides* Kunth, coletada em Anapurus, Estado do Maranhão, Brasil, apresentou óleo essencial rico em 1,8-cineol (64,1%) [16]. O óleo obtido de um espécime coletado em Oriximiná, Estado do Pará, Brasil, também apresentou carvacrol (38%) como o principal constituinte [8]. Óleos de três espécimes com ocorrência nas regiões de Santander, Cauca, Nariño e Boyacá, na Colômbia, mostraram diferentes composições: (A) quimiotipo *p*-cimeno (12%), (B) quimiotipo carvacrol (aprox. 40%) e (C) quimiotipo timol (aprox. 56%) [17]. Finalmente, um óleo rico em (*E*)-metil cinamato (52,4%) e (*E*)-nerolidol (23,2%) foi relatado para um espécime de *L. origanoides* com ocorrência na Floresta Nacional de Carajás, Parauapebas, Pará, Brasil [18]. O gênero *Lippia*, com mais de cinquenta óleos essenciais relatados, é bem conhecido por seu carácter aromático [19]. Outras espécies do gênero *Lippia* com ocorrência no Brasil demonstraram uma ampla variação na composição de óleo com a descrição de vários quimiotipos. Amostras de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br, coletadas nos estados do Pará e Ceará, com os tipos citral, carvona e 1,8-cineol [20]; e *Lippia glandulosa* Schauer com ocorrência natural no estado de Roraima, com os tipos timol e β -cariofileno [21]. Grande percentual de timol e carvacrol foram também identificadas em *Lippia gracilis* Schauer e *Lippia sidoides* Cham. Coletadas no Nordeste do Brasil [22,23].

As diferenças na composição de óleos essenciais podem ser atribuídas à influência da fase fenológica e dos fatores ambientais descritos para os locais de coleta de plantas. Estes fenômenos podem alterar significativamente as vias bioquímicas e processos fisiológicos que regulam o metabolismo da planta e, por conseguinte, a biossíntese de óleos essenciais [24].

4.2. Atividade antimicrobiana

Diferentes espécies de *Lippia* são conhecidas pela produção de óleo essencial com potencial antimicrobiano. Entre estas, *L. chevalieri* Moldenke e *L. multiflora* Moldenke [25], *L. javanica* Spreng. [26], *L. sidoides* Cham. [22], *L. alba* (Mill.) NE Brown [27], *L. gracilis* Schauer [23], *L. palmieri* S. Wats [28] e *L. origanoides* Kunth [9]. No presente estudo, a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *L. origanoides* quimiotipo carvacrol foi avaliada contra microorganismos patogênicos relacionados a alimentos, usando os métodos padrões de disco-difusão em agar e microdiluição em caldo. Os diâmetros das zonas de inibição do crescimento de microorganismos, a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) encontram-se representados na Tabela 02.

Tabela 02 - Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Lippia origanoides* contra bactérias patogênicas relacionadas a alimentos.

Microorganismos	Óleo essencial			Ampicilina		
	DD (mm) 10 µL	CIM µL mL ⁻¹	CBM µL mL ⁻¹	DD (mm) 10 µg	CIM µg mL ⁻¹	CBM µg mL ⁻¹
<i>Salmonella typhimurium</i> CCCD S004	27,9 ± 0,4*	1,25	10	19,1 ± 0,2	1,5	2,9
<i>Bacillus cereus</i> CCCD B001	50,9 ± 0,6*	0,62	>20	23,4 ± 0,2	1,5	5,8
<i>Bacillus subtilis</i> CCCD B005	35,8 ± 0,3*	1,25	1,25	21,0 ± 0,2	0,18	0,18
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27953	na	nt	Nt	na	nt	nt

* $p \leq 0,05$ – Significância relativa ao controle; DD = disco-difusão; CIM = Concentração Inibitória Mínima; CBM = Concentração Bactericida Mínima; na = não ativo; nt = não testado.

O óleo de *L. origanoides* exibiu atividade antimicrobiana significativa ($p < 0,05$), quando comparado ao controle positivo. As zonas de inibição variaram de 27,9 a 50,9 mm, apresentando forte atividade antimicrobiana contra os microrganismos testados, exceto frente à *Pseudomonas aeruginosa*, que apresentou perfil de resistência frente ao óleo. A maior zona de inibição e menor valor de CIM foram observados frente à *Bacillus cereus* (50,9 mm, 0,62 µL mL⁻¹), seguidos por *Bacillus subtilis* (35,8 mm, 1,25 µL mL⁻¹) e *Salmonella typhimurium* (27,9 mm, 1,25 µL mL⁻¹).

Em geral, a atividade antimicrobiana de óleos essenciais é classificada em diferentes níveis: fraca atividade (zona de inibição ≤ 12 mm), atividade moderada (12 mm < zona de inibição < 20 mm) e forte atividade (zona de inibição ≥ 20 mm) [29]. É importante levar em consideração que a concentração de carvacrol e timol no óleo de *L. origanoides* é de aproxim. 60%. A atividade antimicrobiana de carvacrol e timol foi previamente reportada [30,31]. Carvacrol e timol são biossintetizados a partir dos monoterpênicos fenólicos γ -terpineno e p -cimeno, e estes últimos compostos estão sempre presentes no mesmo óleo.

A diferença na fórmula de timol e carvacrol é a posição do grupo hidroxila no anel fenólico [31]. No entanto, independentemente da posição do grupo hidroxila, carvacrol e timol apresentam potencial antimicrobiano semelhante [30]. O mecanismo de ação de carvacrol e timol envolve a ruptura da membrana celular com posterior fuga do conteúdo citoplasmáticos [32]. Em bactérias Gram-negativas, carvacrol e timol promovem a desintegração da membrana externa, libertando lipopolissacáridos e aumentando a permeabilidade da membrana citoplasmática [2].

Na análise de agentes antimicrobianos, as plantas podem ter vantagens em relação às drogas sintéticas, uma vez que muitos dos seus componentes podem ter efeitos biológicos semelhantes, atuando sinergicamente e aumentando o seu efeito terapêutico. A atividade

antimicrobiana dos óleos essenciais pode depender de apenas um ou dois dos principais componentes presentes no óleo. O sinergismo (parcial ou total) entre o carvacrol e o timol foi reportado para controlar o crescimento de microorganismos [33]. No entanto, as evidências indicam que a atividade inerente de óleos essenciais podem não depender exclusivamente da relação em que os principais componentes ativos estão presentes, mas também das interações entre estes e os constituintes minoritários [1]. Por exemplo, ρ -cimeno (precursor biossintético de carvacrol e timol), presente no óleo de *L. origanoides* (9,7%), não é um agente antimicrobiano eficaz quando utilizado isoladamente, porém, quando em conjunto com carvacrol e timol, ρ -cimeno pode potencializar a ação do óleo por promover a expansão da membrana citoplasmática e facilitar a ação antimicrobiana destes fenóis monoterpênicos [30]. Além disso, linalol (álcool monoterpênico - 2,9%) pode também contribuir aditivamente para a atividade antibacteriana do óleo essencial de *L. origanoides*, uma vez que sua ação antimicrobiana foi comprovada previamente [34]. Assim, os resultados acima evidenciam a eficácia do óleo de *L. origanoides* contra microorganismos patogênicos envolvidos na deterioração e/ou a contaminação de alimentos.

4.3. Atividade antioxidante

No presente trabalho, a atividade antioxidante do óleo de *L. origanoides* foi avaliada por dois diferentes ensaios: sequestro de radicais DPPH e auto-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico. No ensaio de sequestro de radicais DPPH, a habilidade do óleo essencial em agir como doador de átomos de hidrogênio ou elétrons, na transformação de DPPH em sua forma reduzida DPPH - H (difetilpicrilhidrazina) foi medida espectrofotometricamente. Neste ensaio, o óleo foi capaz de promover a redução do radical DPPH, exibindo elevada dose-resposta ($r^2 = 0,92$), com inibição variando de 15% a 82%, em concentrações de 5 a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, demonstrando que o percentual antioxidante aumenta proporcionalmente à concentração de óleo adicionado. A concentração do óleo essencial necessária para reduzir a concentração inicial do radical DPPH em 50% (EC_{50}), calculada por regressão linear ($p < 0,05$), foi determinada em $23 \pm 1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, o que representa uma atividade antioxidante significativa se comparável ao padrão Trolox ($3 \pm 0,3 \mu\text{g mL}^{-1}$). Os resultados obtidos após a determinação da atividade antioxidante do óleo essencial em diferentes concentrações estão representados na Tabela 03. Valores de EC_{50} inferiores a 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ indicam um potencial significativo de eliminação de radicais [35].

Table 03 - Capacidade antioxidante do óleo essencial de *Lippia origanoides* (OELO) no ensaio de sequestro do radical DPPH.

Amostras	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Inibição (%)	EC ₅₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
OELO	50	81,5 ± 4,9	23 ± 1,5
	40	73,6 ± 3,5	
	30	68 ± 4,9	
	20	54,5 ± 2,6	
	10	31,6 ± 0,9	
	5	15,1 ± 3,5	
Trolox	5	80,3 ± 5,4	3 ± 0,3
	4	64,2 ± 4,6	
	3	53,8 ± 4,6	
	2	36,4 ± 5,2	
	1	17,2 ± 2,2	

EC₅₀ - Concentração necessária para reduzir a concentração inicial do radical DPPH em 50%

O ensaio de auto-oxidação do β -caroteno foi avaliado por inibição da atividade dos radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico em presença do óleo essencial. Assim, foi possível avaliar a atividade antioxidante do óleo de *L. origanoides* em comparação com os antioxidantes sintéticos BHA e Trolox. A inibição da oxidação promovida pelo óleo essencial foi de $85,2 \pm 6,8\%$. Este valor representa aprox. 80% do valor de inibição observado para Trolox ($93,4 \pm 0,7\%$). A capacidade do óleo de *L. origanoides* em inibir a oxidação do β -caroteno em relação ao BHA e Trolox é apresentada graficamente na Figura 01.

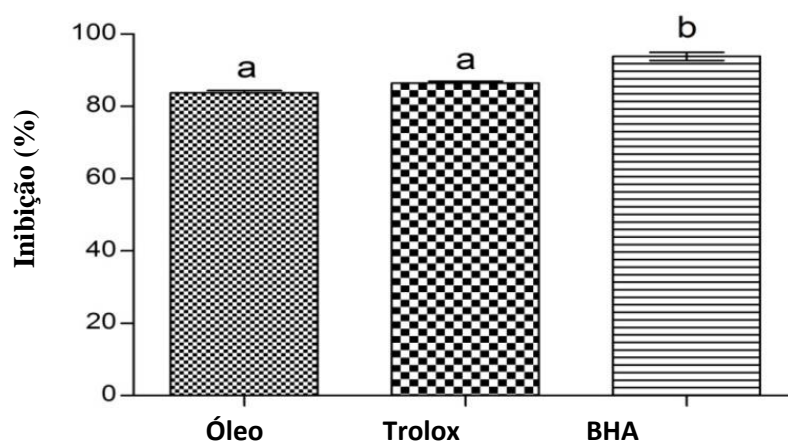


Figura 01 – Percentual de inibição da atividade dos radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico em presença do óleo essencial de *Lippia origanoides*.

Segundo Ramalho e Jorge, [36], antioxidantes fenólicos funcionam como sequestradores de radicais e, algumas vezes, como quelantes de metais, agindo tanto na etapa de iniciação quanto na propagação do processo oxidativo. A atividade antioxidante do óleo

essencial de *L. origanoides* rico em compostos fenólicos como carvacrol e timol, obtido de espécimes coletadas na região de Santander, Colômbia, foi relatada anteriormente [37]. Neste estudo, usando o método ABTS, os autores observaram que óleo apresentou atividade antioxidante inferior aos antioxidantes sintéticos BHA e α -tocoferol, e elevada atividade, quando comparado ao BHT.

A ação antioxidante de um composto natural é um processo complexo que normalmente ocorre por vários mecanismos. Assim, o resultado de um único ensaio para óleos essenciais pode dar apenas uma sugestão relativa às suas propriedades antioxidantes e, em matrizes alimentares, estes resultados devem ser interpretados com maior cautela. Além disso, o óleo essencial é uma mistura química complexa, composta por dezenas de componentes com diferentes grupos funcionais, polaridade, e comportamento químico. Assim, dependendo do ensaio utilizado, diferentes resultados podem ser obtidos, dificultado explicar os diferentes resultados de atividade antioxidante descritos acima [38].

Dessa forma, a avaliação antioxidante não deve se basear apenas em uma única metodologia, sendo necessários outros métodos para caracterizar completamente um composto como antioxidante. Por esta razão, os ensaios de sequestro de radicais DPPH e auto-oxidação do β -caroteno foram utilizados na análise da atividade antioxidante do óleo de *L. origanoides* e, como observado, os resultados de ambos os testes foram eficazes e complementares.

4.4. Determinação da DL₅₀

A DL₅₀, obtida por interpolação semi-logarítmica, foi determinada em 1.673,84 mg kg⁻¹, indicando baixa toxicidade. Durante as primeiras 4 horas de observação, apenas os animais que receberam a dose de 3.000 mg kg⁻¹, apresentaram letargia e piloereção; nas demais doses testadas, nenhuma mudança nos parâmetros fisiológicos ou comportamentais foi observada. Andrade [39], também não observaram alterações fisiológicas ou comportamentais, após administração oral aguda do óleo essencial de *L. origanoides*, nas doses de 30, 60 e 120 mg Kg⁻¹.

Conclusões

O óleo essencial de *L. origanoides* foi eficaz tanto no controle do crescimento de microrganismos, quanto no retardo do processo de oxidação. Apresenta baixa toxicidade, representando, portanto, uma alternativa viável na conservação de alimentos processados.

Referências

1. Hyldgaard M, Mygind T, Meyer RL: **Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components.** *Front Microbiol* 2012, **3**: 1-24.
2. Burt S: **Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review.** *Int J Food Microbiol* 2004, **94**: 223-253.
3. Oke F, Aslim B, Ozturk S, Altundag S: **Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja cuneifolia* Ten.** *Food Chem* 2009, **112**: 874-879.
4. Yanishlieva NV, Marinova EM, Gordon MH, Raneva VG: **Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems.** *Food Chem* 1999, **64**: 59-66.
5. Roby MHH, Sarhan MA, Selim KA-H, Khalel KI: **Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.).** *Ind Crops Prod* 2013, **44**: 437-445.
6. Arora DS, Kaur J: **Antimicrobial activity of spices.** *Int J Antimicrob Ag* 1999, **12**: 257-262.
7. Fabri RL, Nogueira MS, Moreira JR, Bouzada MLM, Scio E: **Identification of antioxidant and antimicrobial compounds of *Lippia* species by bioautography.** *J Med Food* 2011, **14**: 840-846.
8. Oliveira DR, Leitão GG, Bizzo HR, Lopes D, Alviano DS, Alviano CS, Leitão SG: **Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K.** *Food Chem* 2007, **101**: 236-240.
9. Sarrazin SLF, da Silva LA, de Assunção APF, Oliveira RB, Calao VYP, da Silva R, Stashenko E. E, Maia JGS, Mourão RHV: **Antimicrobial and seasonal evaluation of the carvacrol-chemotype oil from *Lippia origanoides* Kunth.** *Molecules* 2015, **20**: 1860-1871.
10. Adams RP: *Identification of essential oil Components by gas chromatography/mass spectrometry.* 4th edition. Carol Stream, IL: Allured Publ. Corp; 2007.
11. NIST - National Institute of Standards and Technology: *Mass Spectral Library (NIST/EPA/NIH).* Gaithersburg, MD: The NIST Mass Spectrometry Data Center; 2005.
12. NCCLS/CLSI - National Committee for Clinical Laboratory Standards/Clinical and Laboratory Standards Institute: *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests.* Document M2-A9 - Approved standard. Wayne, Pennsylvania, EUA: 2006.
13. NCCLS/CLSI - National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Reference method for broth dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically.* Approved Standard, document M7-A6, 2004.

14. da Silva JKR, Andrade EHA, Guimarães EF, Maia JGS: **Essential oil composition, antioxidant capacity and antifungal activity of *Piper divaricatum***. *Nat Prod Commun* 2010, **3**: 477-480.
15. Santos FJB, Lopes JAD, Cito AMGL, Oliveira EH, Lima SG, Reis FAM: **Composition and biological activity of essential oil from *Lippia origanoides* HBK**. *J Essent Oil Res* 2004, **16**: 504-506.
16. Silva NA, da Silva JKR, Andrade EHA, Carreira LMM, Sousa PJC, Maia JGS: **Essential oil composition and antioxidant capacity of *Lippia schomburgkiana***. *Nat Prod Commun* 2009, **4**: 1281-1286.
17. Stashenko EE, Martínez JR, Ruíz CA, Arias G, Durán C, Salgar W, Cala M: ***Lippia origanoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis**. *J Sep Sci* 2010, **33**: 93-103.
18. Ribeiro AF, Andrade EHA, Salimena FRG, Maia JGS: **Circadian and seasonal study of the cinnamate chemotype from *Lippia origanoides* Kunth**. *Biochem Syst Ecol* 2014, **55**: 249-259.
19. Pascual ME, Slowing K, Carretero E, Mata DS, Villar A: ***Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review**. *J Ethnopharmacol* 2001, **76**: 201-214.
20. Zoghbi MGB, Andrade EHA, Santos AS, Silva MHL, Maia JGS: **Essential oils of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. growing wild in the Brazilian Amazon**. *Flav Fragr J* 1998, **13**: 47-48.
21. Maia JGS, Silva MHL, Andrade EHA, Carreira LMM: **Essential oil variation in *Lippia glandulosa* Schauer**. *J Essent Oil Res* 2005, **17**:676-680.
22. Botelho MA, Nogueira NAP, Bastos GM, Fonseca SGC, Lemos TLG, Matos FJA: **Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens**. *Braz J Med Biol Res* 2007, **40**: 349-356.
23. Neto RM, Matos FJA. Andrade VS, Melo MCM, Carvalho CBM, Guimarães SB: **The essential oil from *Lippia gracilis* Schauer, Verbenaceae, in diabetic rats**. *Rev Bras Farmacogn* 2010, **20**: 261-266.
24. Sangwan NS, Farooqi AHA, Shabih F, Sangwan RS: **Regulation of essential oil production in plants**. *Plant Growth Regul* 2001, **34**: 3-21.
25. Bassole IHN, Ouattara AS, Nebie R, Ouattara CAT, Kabore ZI, Traore AS: **Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso**. *Phytochemistry* 2003, **62**: 209-212.
26. Viljoen AM, Subramoney S, van Vuuren SF, Baser KHC, Demirci B: **The composition, geographical variation and antimicrobial activity of *Lippia javanica* (Verbenaceae) leaf essential oils**. *J Ethnopharmacol* 2005, **96**: 271-277.

27. Aguiar JS, Costa M CCD, Nascimento SC, Sena KXFR: **Atividade antimicrobiana de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae).** *Rev Bras Farmacogn* 2008, **18**: 436-440.
28. Ortega-Nieblas MM, Robles-Burgeoño MR, Acedo-Félix E, González-Léon A, Morales-Trejo A, Vázquez-Moreno L: **Composición química e actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano (*Lippia palmieri* S. Wats).** *Rev Fitotec Mex* 2011, **34**: 11-17.
29. Rota MC, Herrera A, Martínez RM, Sotomayor J, Jordán MJ: **Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils.** *Food Control* 2008, **19**: 681-687.
30. Ultee A, Bennik MHJ, Moezelaar R: **The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*.** *Appl Environ Microbiol* 2002, **68**: 1561-1568.
31. Baser KHC: **Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils.** *Curr Pharm Design* 2008, **14**: 3106-3120.
32. Lambert RJW, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas G-JE: **A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol.** *J Appl Microbiol* 2001, **91**: 453-462.
33. Didry N, Dubreuil L, Pinkas M: **Antimicrobial activity of thymol, carvacrol and cinnamaldehyde alone or in combination.** *Pharmazie* 1993, **48**: 301-304.
34. Hussain AI, Anwar F, Sherazi STH, Przybylski R: **Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations.** *Food Chem* 2008, **108**: 986-995.
35. Ramos A, Visozo A, Piloto J, Garcia A, Rodriguez CA, Rivero R: **Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in Cuban medicinal plants.** *J Ethnopharmacol* 2003, **87**: 241-246.
36. Ramalho, V.C e Jorge, N. **Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos.** *Química Nova* 2006, **29**: 755-760.
37. Acevedo AM, Castañeda ML, Blanco KM, Cardenas CY, Reyes JA, Kouznetsov V, Stashenko EE: **Composición e capacidad antioxidante de especies aromáticas y medicinales com alto contenido de timol e carvacrol.** *Scientia et Technica* 2007, Año XIII, No. 33.
38. Ruberto G, Baratta MT: **Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems.** *Food Chem* 2000, **69**: 167-174.
39. Andrade, V.A.; Almeida, A.C.; Souza, D.S.; Colen, K.J.F.; Macêdo, A.A.; Martins, E.R.; Fonseca, F.S.A.; Santos, R.L: **Antimicrobial activity and acute and chronic toxicity of the essential oil of *Lippia origanoides*.** *Pesq. Vet. Bras.* 2014, **34**: 1153-1161.

CAPÍTULO III

***Quimiossensibilização antifúngica através da indução do estresse oxidativo: Um modelo para o controle da candidíase com base no óleo essencial de *Lippia origanoides* Kunth**

Sandra Layse Ferreira Sarrazin ^a, Jean-Paul Bourdineaud ^b, Ricardo Bezerra de Oliveira ^{c,e}, José Guilherme Soares Maia ^{c,d}, Maria Beatriz Viana dos Santos ^e, Rosa Helena Veras Mourão ^{a,c,e}

Resumo

Introdução: Este trabalho descreve a composição química do óleo essencial (OE) de *Lippia origanoides* Kunth e atividade anti-*Candida* do óleo isolado e em combinação com fluconazol. **Métodos:** O OE foi obtido por hidrodestilação e analisado por CG e CG-EM, destacando carvacrol (46,1%) e timol (11,84%) como os principais componentes. A atividade antifúngica contra espécies de leveduras do Gênero *Candida* foi analisada pelos métodos padrões de disco-difusão e micro diluição em caldo. A concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima (CIM e CFM) foram determinadas em 0,62, 1,25 e 0,31 $\mu\text{L mL}^{-1}$ e 5,0, 2,5 e 0,62 $\mu\text{L mL}^{-1}$ frente à *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* respectivamente. Para avaliar o efeito antifúngico quimiossensibilizante do OE de *L. origanoides*, culturas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* Δycf1 foram expostas a concentrações sub-inibitórias do OE (0,25 e 0,125 $\mu\text{L mL}^{-1}$), e a expressão de genes de resposta ao stress oxidativo e potencial mutagênico foi analisada pelo método da reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR). Os perfis de expressão, quando comparados aos perfis apresentados por culturas não tratadas, mostraram que o OE de *L. origanoides* promoveu mudanças nos padrões de expressão de genes envolvidos na resistência ao estresse oxidativo e mutagênico. A utilização combinada de doses sub-inibitórias do OE com Fluconazol foi testada em leveduras do Gênero *Candida* e a estratégia resultou na potencialização da ação deste antifúngico azólico. Em associação com 0,125 $\mu\text{L mL}^{-1}$ do OE de *L. origanoides*, a CIM do Fluconazol reduziu de 1,05, 1,05, e 0,12 para 0,03, 0,03, e 0,01 mg mL^{-1} frente a *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, respectivamente. **Conclusão:** O uso combinatório do OE de *L. origanoides* como agente antifúngico quimiossensibilizante deverá contribuir para melhorar a eficiência dos antifúngicos convencionais, reduzindo seus efeitos colaterais negativos.

Palavras-chave: *Candida*, *Lippia origanoides*, óleo essencial, quimiossensibilização, estresse oxidativo.

Abstract

Background: This work describes the chemical composition of the essential oil (EO) of *Lippia origanoides* Kunth and its anti-Candida activity alone and in combination with fluconazole. **Methods:** The EO was obtained by hydrodistillation and analyzed by GC and GC-MS. Antifungal activity against *Candida* species was unraveled by disk diffusion and micro-dilution assay. To evaluate the antifungal chemosensitizing effect through induction of oxidative stress, cultures of the model yeast *Saccharomyces cerevisiae* Δ ycf1 were exposed to subinhibitory concentrations of the *L. origanoides* EO (0.25 and 0.125 $\mu\text{L mL}^{-1}$), and the expression of genes known, due be over expressed in response to oxidative and mutagenic stress was analyzed by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) method. **Results:** Carvacrol (46.1 %) and thymol (11.84 %) were identified as the main components. The MIC and MFC were 0.62, 1.25, 0.31 $\mu\text{L mL}^{-1}$ and 5.0, 2.5, 0.62 $\mu\text{L mL}^{-1}$ for *Candida albicans*, *C. tropicalis* and *C. parapsilosis*, respectively. The gene expression profiles, when compared with that of untreated cultures, showed that *L. origanoides* EO promoted changes in the patterns of expression of genes involved in oxidative and mutagenic stress resistance. The combined use of the EO with Fluconazole has been tested on *Candida* yeasts and the strategy resulted in a synergistic enhancement of the antifungal action of the azolic chemical product. Indeed, in association with 0.125 $\mu\text{L mL}^{-1}$ of *L. origanoides* EO, the fluconazole MICs dropped from 1.05, 1.05, and 0.12 down to 0.03, 0.03, and 0.01 mg mL^{-1} for *C. albicans*, *C. tropicalis* and *C. parapsilosis*, respectively. **Conclusion:** The combinatorial use of *L. origanoides* EO as chemosensitizer agent, should contribute to enhance the efficiency of conventional antifungal drugs, reducing their negative side effects.

Keywords - *Candida*, *Lippia origanoides*, essential oil, chemosensitizing effect, oxidative stress.

* Parte da Tese de Doutorado da primeira autora, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da rede BIONORTE. ^a Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal, Universidade Federal do Amazonas, 60077-000 Manaus, AM, Brasil. ^b Universidade de Bordeaux, CNRS, UMR EPOC 5805, Estação Marinha de Arcachon, Praça Dr. Peyneau, 33120, Arcachon, França. ^c Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais da Amazônia – Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA, CEP: 68135-110, Santarém - PA, Brasil. ^d Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Federal do Pará, 66075-110 Belém, PA, Brasil. ^e Programa de Pós-graduação em Biociências – Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA, CEP: 68135-110, Santarém, PA, Brasil.

1. Introdução

Espécies do Gênero *Candida* são responsáveis por um grande número de casos de infecções ocasionadas por fungos oportunistas. Pacientes imunocomprometidos, tais como indivíduos infectados pelo HIV, pacientes transplantados e pacientes com câncer são particularmente vulneráveis e podem morrer principalmente devido a infecções fúngicas oportunistas invasivas (Binder e Lass-Flörl, 2011). Atualmente, em adição à elevada toxicidade e o espectro limitado de atividade exibida por algumas classes de antifúngicos comerciais, juntamente com a utilização imprópria ou excessiva de antibióticos, são fatores que têm contribuído para o desenvolvimento de resistência às principais classes de drogas antifúngicas disponíveis. Assim, a constante busca por novos compostos eficazes, que possam ser utilizados como terapia alternativa, torna-se necessária (Agarwal et al., 2010).

Os óleos essenciais (OE) têm apresentado atividade antifúngica contra agentes micóticos cutâneos e sistêmicos e são fontes potenciais de novos compostos antifúngicos, representando uma alternativa para o tratamento de doenças infecciosas. Em baixas concentrações, os OE também podem agir como quimiossensibilizantes antifúngicos, conferindo uma nova estratégia na qual a co-aplicação destes compostos, juntamente com um antifúngico convencional, pode aumentar a eficácia deste fármaco (Campbell et al., 2012).

O OE de *Lippia origanoides* Kunth (Verbenaceae), conhecido no norte do Brasil como "salvia de Marajó", foi relatado por apresentar atividade antimicrobiana, a qual foi atribuída à presença de timol e carvacrol em sua composição química (Santos et al., 2004; Oliveira et al., 2007). Carvacrol e timol são monoterpenos isoméricos encontrados no OE de plantas que apresentam forte atividade antifúngica, entre outros contra *Candida spp.* (Ahmad et al., 2011; Khan et al., 2015). No entanto, em concentrações sub-inibitórias, a resposta de uma célula viva, a nível molecular, frente à OE, ainda não é conhecida. Assim, uma exploração sobre o assunto faz-se necessária.

O primeiro passo neste estudo foi determinar a suscetibilidade de *Candida albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* frente ao OE obtido de amostras de *L. origanoides*, coletadas no Estado do Pará, Brasil. O segundo passo foi analisar o efeito quimiossensibilizante de concentrações sub-inibitórias deste OE, explorando respostas ao estresse oxidativo e mutagênico, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* como modelo experimental. Além da vantagem de ser um microrganismo unicelular de crescimento rápido, *S. cerevisiae* possui sequenciamento genômico completo, e cepas mutantes com reconhecida sensibilidade a agentes indutores de estresse oxidativo estão disponíveis (Jia et al., 2002; Brennan et al., 1996). Além disso, *S. cerevisiae* está mais intimamente relacionada com

Candida albicans, espécie considerada como um dos principais agentes fúngicos patogênicos oportunistas (Barns, et al., 1991; Hughes, 2002; Agarwal et al., 2003).

Para avaliar o potencial quimiosensibilizante do OE de *L. origanoides*, células de *S. cerevisiae* $\Delta ycf1$ (mutante portadora de deficiência no sistema de transporte vacuolar do Cd^{2+}) foram expostos a concentrações sub-inibitórias do OE e as mudanças nos padrões de expressão de genes de resposta ao estresse oxidativo e mutagênico (GSH1, KAR2, PRX1 e RNR3) foram analisadas pelo método qRT-PCR. Estes genes foram selecionados por serem super-expressos em situações em que o estado oxidativo e mutagênico da célula é aumentado. Assim, analisar o potencial quimiosensibilizante de concentrações sub-inibitórias de OE poderá auxiliar no desenvolvimento de novas drogas antifúngicas de uso combinatório.

2. Material e Métodos

2.1. Material vegetal

Partes aéreas (folhas e ramos finos) de *L. origanoides* foram coletadas na cidade de Santarém, Pará, Brasil, em julho de 2012. A posição geográfica intermediária das amostras foi determinada utilizando o Sistema de Posicionamento Global (GPS), resultando nas seguintes coordenadas: 02°30'870"S e 54°56'416"W, a uma altitude de aproximadamente 52 m acima do nível do mar. O material botânico foi morfologicamente identificado pela Dra. Fátima Regina Gonçalves Salimena - Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora, Brasil, onde um exemplar foi depositado e catalogado sob o código CESJ 64029.

2.2. Extração do óleo essencial

Partes aéreas de *L. origanoides* foram trituradas e submetidas ao processo de hidrodestilação, utilizando um aparelho do tipo Clevenger, com tempo de extração fixado em 3 h. Para isso, 200 g de material fresco foram imersos em água destilada a uma razão de 1:10 (p:v). O óleo essencial obtido foi seco em sulfato de sódio anidro e o rendimento foi calculado com base no peso seco da planta. O procedimento foi realizado em triplicata, resultando em um rendimento de 1,5 % de óleo essencial.

2.3. Análise química do óleo essencial por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

A análise da composição química do OE foi realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) utilizando um equipamento Agilent, (modelo 6890, mais o sistema CG série), equipado com um detector seletivo de massa (Agilent, MSD 5973), e um amostrador automático (Agilent, 7863). A análise foi realizada em coluna capilar apolar DB-5 ms (J & W Scientific, Folsom, CA, EUA) (espessura de película de 60 m × 0,25 mm). A temperatura do forno foi estabelecida a 50°C (+5 min. em modo isotérmico), elevando de 4 °C min⁻¹ até 150 °C (+2 min. em modo isotérmico) e em seguida elevada em 5 °C min⁻¹ até 250°C, (mantida isotermicamente durante 5 min.) e aumentando 10 °C min⁻¹ até 275°C (constante durante 15 min.). Hélio foi utilizado como gás de arraste, com fluxo constante de 0,6 mL min⁻¹ e pressão de entrada de 16,5 psi. Amostras do óleo essencial (1 µL) foram diluídas em hexano e injetadas em modo split. Os espectros de massa foram obtidos por impacto eletrônico a 70 eV de energia. As temperaturas da câmara de ionização e a linha de transferência foram mantidas a 230-285°C, respectivamente. Os dados quantitativos sobre os constituintes voláteis foram obtidos por normalização de área de pico, utilizando um CG 6890 Plus Series acoplado ao detector FID, operado sob condições semelhantes ao sistema de CG-EM. O índice de retenção foi calculado para todos os componentes voláteis, utilizando uma série homóloga de n-alcanos (Sigma-Aldrich) em C8-C30, de acordo com a equação linear de Van den Dool e Kratz (1963).

2.4. Condições de cultivo de microorganismos e determinação da atividade antifúngica do OE de *L. origanoides*

2.4.1. Leveduras do gênero *Candida* e padronização do inóculo

A atividade antifúngica do óleo essencial foi analisada frente a três cepas de leveduras: *C. albicans* (CCCD - CC001), *C. tropicalis* (CCCD - CC002) e *C. parapsilosis* (CCCD - CC003). As cepas foram adquiridas na forma liofilizada (Cefar diagnóstico, São Paulo - Brasil), e reidratadas em 1 mL de caldo Sabouraud Dextrose - SDB (Himedia, Mumbai - Índia) a 27 ± 2°C durante 24 h. Os inoculi foram preparados por inoculação direta de colônias isoladas em 1 mL de solução salina estéril e posteriormente ajustados ao padrão 0,5 da escala de McFarland, correspondendo a 2 - 5 × 10⁶ UFC mL⁻¹ (NCCLS/CLSI - National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002).

2.4.2. Determinação da atividade antifúngica do óleo essencial de *L. origanoides* em leveduras do gênero *Candida*

2.4.2.1 Método de disco-difusão em agar

Este teste, com base na metodologia padronizada por Bauer e colaboradores (1966), foi utilizado para avaliar o espectro de inibição do óleo essencial contra os microorganismos ensaiados. Os inoculi foram semeados em ágar Sabouraud dextrose (SDA) e logo após, discos de papel de filtro (6 mm de diâmetro), contendo 10 µL de OE não diluído, foram levemente pressionados contra a superfície do agar. Após 30 min. à temperatura ambiente, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 h. No final do período de incubação, o diâmetro da zona de inibição foi mensurado em milímetros. Os testes foram realizados em triplicata.

2.4.2.2. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM)

Para determinação da CIM e CFM, uma diluição em série do OE de *L. origanoides* ($10 - 0,007 \mu\text{L mL}^{-1}$) foi preparada utilizando Tween 80 (solução a 0,5%) como solvente (Sigma-Aldrich, São Paulo - Brasil). Os testes foram realizados em placas de 96 poços, onde cada poço recebeu 90 µL da concentração específica de OE, 90 µL de meio líquido Sabouraud Dextrose (SDB) e 20 µL do inóculo correspondendo a $1,5 \times 10^5 \text{ UFC mL}^{-1}$. As culturas foram incubadas a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 h (NCCLS/CLSI, 2002).

Para testar a possível inibição de crescimento desencadeada pelo OE, 20 µL de solução aquosa de resazurina a 0,02% (Vetec, Rio de Janeiro - Brasil) foram adicionados a cada poço, e as culturas foram re-incubadas por mais 3 h. A mudança de cor de azul para rosa, resultante do processo de redução de resazurina à refazurina, indicou a presença de microorganismos viáveis. Os valores de CIM foram definidos pela menor concentração do OE capaz de inibir o crescimento dos microorganismos. Os poços que não mostraram crescimento aparente foram selecionados para avaliação da CFM, que foi determinada pela ausência de crescimento microbiano após semeio em placas contendo SDA. CFM é definida como a menor concentração do OE capaz de eliminar 99,99% dos microorganismos. Para fins comparativos, Fluconazol foi utilizado como controle padrão positivo. Os testes foram realizados em triplicata.

O potencial quimiosensibilizante antifúngico de concentrações sub-inibitórias do OE de *L. origanoides* (0,125 e $0,25 \mu\text{L mL}^{-1}$) também foi determinado utilizando o ensaio de microdiluição em caldo. Resumidamente, 20 µL do OE foi adicionado a placas de 96 poços já contendo 20 µL do antifúngico padrão (Fluconazol) em diluições em série variando de 2,1 a

0,01 mg mL⁻¹. Em seguida, em cada poço adicionou-se 160 µL do inóculo com aproximadamente 1,5 x 10⁴ UFC mL⁻¹. As placas foram incubadas a 27 ± 2°C durante 24 h. A inibição do crescimento foi confirmada utilizando a solução de resazurina em meio líquido, tal como descrito acima. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

2.5. Potencial quimiosensibilizante do óleo essencial de *Lippia origanoides* por indução de estresse oxidativo

2.5.1. Microorganismo modelo e condições de cultivo

Para determinação da concentração sub-inibitória e expressão de genes de resposta ao estresse oxidativo e potencial mutagênico, utilizou-se a levedura *S. cerevisiae* *Δycf1* (YDR1356) como modelo experimental. A cepa de levedura foi gentilmente cedida pelo Dr. Daniel Brèthes (Centro Nacional de Pesquisa Científica - Institut de Bioquímica Genética et Cellulaire - França). O meio de cultivo YPD (extrato de levedura peptonadextrose) contendo 0,5% de extrato de levedura, 2% de bacto-peptona e 2% de glucose foi usado para crescimento de rotina.

2.5.2. Determinação da concentração sub-inibitória do OE de *L. origanoides* sobre células de *S. cerevisiae*

Este experimento foi realizado para determinar a concentração sub-inibitória do OE antes de proceder com o ensaio de quimiosensibilização. Para isso, culturas *over night*, obtidas por inoculação direta de colônias isoladas, foram cultivadas em 1 mL de caldo YPD à temperatura de 27 ± 2°C e agitação de 225 rpm. Após diluição em 25 mL de caldo YPD estéril, o crescimento foi monitorado por densidade óptica a 600 nm (DO₆₀₀). As culturas foram distribuídas em tubos Falcon (1 mL/tubo, DO₆₀₀ = 0,3) e, subsequentemente, soluções estoque do OE, diluídas em Tween 80 (0,5%) foram adicionadas, obtendo concentrações finais de 5,0, 2,0, 0,5, 0,25 e 0,125 µL mL⁻¹. Cádmio (Cd⁺²) foi utilizado como controle positivo. Culturas de células não tratadas (livres da exposição ao OE ou ao Cd⁺²) e culturas tratadas com o solvente (Tween 80 a 0,5%) foram também incluídas. Após 3 h de exposição, o crescimento celular foi mensurado por DO₆₀₀. O valor de IC₅₀ foi obtido por análise de regressão linear da curva dose-resposta.

2.5.3. Ensaio de PCR quantitativo em tempo real

A expressão de genes de resposta ao estresse oxidativo e potencial mutagênico foi determinada após exposição de *S. cerevisiae* à duas concentrações sub-inibitórias do OE (0,25 e 0,125 $\mu\text{L mL}^{-1}$). Para isso, células de levedura, crescidas *over night* ($\text{DO}_{600} = 3,8$), foram adicionados a 25 mL de caldo YPD estéril e re-incubadas por 3 h a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ e agitação de 225 rpm. O crescimento foi monitorado por medidas de DO_{600} . Aliquotas de 4 ml ($\text{DO}_{600} = 0,3$) foram expostas ao OE e incubadas durante 3 horas sob as mesmas condições citadas acima. Cd^{+2} (Sigma-Aldrich, São Paulo - Brasil) foi utilizado como composto de referência (concentração final de 10 e 20 μM). Para extração do RNA utilizou-se o kit Absolutely RNA RT-PCR miniprep (Agilent, Stratagene). Os procedimentos para extração seguiram instruções do fabricante, com a seguinte modificação: para cada 100 μL do tampão de lise contendo tiocianato de guanidina e 0,7 mL β -mercaptoetanol, foram subsequentemente adicionados igual volume de esferas de vidro (\emptyset 0,5 mm, Sartorius, BBI-854,701) e igual volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). As células foram rompidas com agitações de 30 seg. em vortex, procedimento realizado 5 vezes, com intervalos de 30 seg. em gelo. O volume de eluição foi de 30 μL e a concentração de RNA foi quantificada utilizando um espectrômetro NanoDrop (Epoch, Biotek).

A pureza do RNA foi verificada para preenchimento dos seguintes requisitos: $\text{A}_{260} / \text{A}_{280} > 1,7$ e $\text{A}_{260} / \text{A}_{230} > 1,5$. A integridade das bandas 18 e 26S ribossomal foi verificada em gel de agarose-formaldeído a 1%. cDNA de primeira cadeia foi sintetizado a partir de 5 μg de RNA total, utilizando o kit AffinityScript Multiple Temperature cDNA Synthesis (Agilent, Stratagene), onde adiciona-se 3 μL de *primers* aleatórios (0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$), 1 μL de AffinityScript Temperatura múltipla - RT, 2 μL de AffinityScript tampão RT - 10x, dNTP (25 mM cada) e água livre de RNase, em volume final de 20 μL . A retrotranscrição foi realizada incubando as reações durante 60 min. a 42°C .

Primers específicos foram determinados usando o software LightCycler (Roche) correspondendo às sequências de codificação dos genes alvo. Os números de acesso GenBank e os pares de *primers* correspondentes estão resumidos na Tabela S1. As reações de qRT-PCR foram realizadas utilizando um sistema de qPCR Mx3000P (Agilent, Stratagene). Cada 25 μL de reação continha 1 μL do molde do produto transcrito reversamente, 12,5 μL de SYBR green qPCR master mix - 2x (Agilent), 2 μL dos pares de *primers* específicos de cada gene (a uma concentração de 300 nM cada) e 9,5 μL de água livre de RNase. O programa utilizado foi: um ciclo a 95°C durante 10 min., seguidos de 50 ciclos de amplificação a 95°C durante 1 min., 60°C durante 1 min., e 72°C durante 1 min. As curvas padrão foram geradas utilizando moldes de cDNA após diluições de 10x, sendo avaliada para cada par de *primer* específico do gene (uma curva padrão por par). As diluições foram ensaiadas em triplicata para cada par de

primer. As curvas padrão foram feitas através da representação gráfica do Ct (*cycle threshold*) contra o logaritmo da quantidade inicial de molde para cada diluição. A equação da linha de regressão e o valor de r foram também calculados. O coeficiente angular da reta (*slope*) foi usado para calcular a eficiência de hibridização da PCR (E) para cada casal de *primers*, usando a fórmula: $E = 10^{(-1/slope)}$.

As eficiências de hibridação mensuradas foram 2,45, 2,07, 1,77 e 1,97 para os genes GSH1, KAR2, Prx1 e RNR3 respectivamente. O RNA ribossômico 18S foi utilizado como referência, e as seguintes sondas foram concebidas a partir do número de acesso GenBank Z75578: 5'-TCAACACGGGGAAACTCACC-3' para o *forward primer* (direção 5'-3'), correspondente à posição 1191-1210 e 5'-AACCAGCAAATGCTAGCACCA-3' para o *reverse primer* (direção 3'-5'), correspondente à posição 1370-1350. A eficiência de hibridação para este par de iniciadores foi de 2,01. A quantificação relativa do nível de expressão de cada gene foi normalizada pela expressão do gene ribossomal 18S e calculada com base no método Pfaffl (Pfaffl, 2001). A fórmula Pfaffl pode ser rearranjada da seguinte maneira:

$$\underbrace{\frac{E_{(ref)} \Delta Ct (amostra-controle)}{E_{(alvo)} \Delta Ct (amostra-controle)}}_D = \underbrace{\frac{E_{(ref)} Ct (amostra)}{E_{(alvo)} Ct (amostra)}}_A \times \underbrace{\frac{E_{(alvo)} Ct (controle)}{E_{(ref)} Ct (controle)}}_{1/B}$$

Onde *D* é a expressão diferencial do gene alvo, ou seja, a expressão do gene alvo na amostra teste em relação à amostra controle; *A* representa a expressão relativa do gene alvo na amostra teste, e *B* representa a expressão relativa do gene alvo na amostra controle. Ambos *A* e *B* são expressões relativas ao gene de referência; Ct é o número de ciclos de PCR necessários para entrar em fase exponencial de amplificação; E (ref) e E (alvo) são as eficiências de hibridação do casal de *primers* específicos para os genes de referência e alvo, respectivamente. Na maioria das vezes, apenas a expressão diferencial, *D*, é exibida em artigos.

No presente texto, decidimos que seria útil visualizar a expressão de genes em relação ao gene de referência *A* e amostras controle *B*. Para cada gene, determinamos o valor médio do nível de expressão relativa, bem como o erro padrão associado (n = 3). Para cada reação, a especificidade foi determinada a partir da curva de dissociação do produto de PCR. Esta curva de dissociação foi obtida seguindo o nível de fluorescência SybrGreen durante um

aquecimento gradual de produtos de PCR de 60 a 95°C. As amostras foram corridas em duplicata em placas de 96 poços opticamente transparentes (ABgene, Thermo Fisher Scientific, EUA). Todos os experimentos de qPCR foram realizadas de acordo com o MIQE (Guia de informações mínimas para a publicação de experimentos de qPCR em tempo real) (Bustin et al., 2009).

Tabela S1 - *Primers* utilizados no ensaio de RT-PCR

Gene	Acesso #	Direção	Sequência	Posição dos <i>primers</i>
<i>RNR3</i>	NM_001179416.1	Forward primer	5'-ATATGGCTGCTGATCGTGCC-3'	2090-2109
		Reverse primer	5'-TCGGTAAGCGCAGATGCCGC-3'	2390-2371
<i>GSH1</i>	NM_001181534.1	Forward primer	5'-GCCACTGGACTATGATCTTG-3'	1200-1219
		Reverse primer	5'-CACGGAATACGCAGCGTTCT-3'	1464-1445
<i>KAR2</i>	NM_001181468.1	Forward primer	5'-CCAGCCAAATGTCCACCCG-3'	959-977
		Reverse primer	5'-GCTGCACCGTATGCAACAGC-3'	1256-1237
<i>PRX1</i>	NM_001178304.1	Forward primer	5'-TTGCCACAGCACCTATTCTG-3'	92-111
		Reverse primer	5'-CGTGGGACTCAACATCTTCC-3'	370-351

3. Análises estatísticas

Os resultados do ensaio de atividade antifúngica e valores de expressão relativa foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). A significância estatística foi determinada por meio da análise de variância One-way (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey, com nível de significância de $p < 0,05$, utilizando o programa GraphPad Prism 3.0, com intervalo de confiança de 95%. O valor de IC₅₀ foi obtido por análise de regressão linear da curva dose- resposta, gerados a partir dos dados de absorbância, utilizando o pacote estatístico Microsoft Excel, onde os valores foram expressos como média \pm desvio padrão (SD) dos experimentos realizados em triplicata.

4. Resultados e Discussão

4.1. Composição química do óleo essencial de *L. origanoides*

A análise do OE de *L. origanoides*, obtido por hidrodestilação, foi realizada por CG e CG-EM. A Tabela 01 mostra os resultados cromatográficos, expressos como percentual de área.

Tabela 01 - Composição química do óleo essencial (OE) de *Lippia organoides* Kunth obtido de amostras coletadas em Santarém, PA, Brasil.

Constituintes	IR _{Calc.}	IR _{Lit.}	OE%
(Z)-Hexen-3-ol	854	859	0,2
α -Tujeno	926	924	0,8
α -Pino	934	932	0,4
1-Octen-3-ol	976	974	0,2
Mirceno	990	988	1,2
α -Terpineno	1016	1014	0,7
<i>p</i> -Cimeno	1025	1020	9,6
Limoneno	1026	1024	0,2
1,8-Cineol	1032	1026	0,7
γ -Terpineno	1056	1054	1,7
Linalol	1098	1095	2,8
Umbelulona	1169	1167	0,4
Terpinen-4-ol	1176	1174	0,9
Timol metil eter	1234	1232	1,6
Isômero do Timol (MW=150)	1282	-	0,4
Timol	1292	1289	11,8
Carvacrol	1299	1298	46,1
Timol acetato	1351	1349	0,6
Carvacrol acetato	1372	1370	1,1
Geranil acetato	1382	1379	0,4
(<i>E</i>)-Cariopileno	1418	1416	2,1
<i>trans</i> - α -Bergamoteno	1434	1432	0,1
α -Humuleno	1455	1452	0,2
<i>p</i> -Metoxitimol	1487	1484	8,4
β -Bisaboleno	1506	1505	0,2
<i>trans</i> - γ -Bisaboleno	1531	1529	0,5
<i>p</i> -Metoxicarvacrol (tent.)	1555	-	1,6
Óxido de cariopileno	1584	1582	2,2
2-Feniletil tiglato	1587	1584	0,2
Epoxido de humuleno II	1611	1608	0,2
α -Bisabolol	1686	1685	0,2
Sesquiterpenos não identificados			1,3
Hidrocarbonetos monoterpenicos			14,6
Monoterpenos oxigenados			76,8
Hidrocarbonetos Sesquiterpenicos			3,1
Sesquiterpenos oxigenados			2,6
Outros			0,6
Total			99

IR_{calc.}: Índice de retenção calculado; IR_{Lit.}: Índice de retenção da literatura (Adams, 2007).

No presente trabalho, identificamos um total de 99% dos compostos químicos presentes no OE de *L. organoides*, sendo 76,8% representados por monoterpenos oxigenados. Os principais compostos voláteis encontrados foram carvacrol (46,1%) e timol (11,8%), totalizando aproximadamente 58% do OE. Outros componentes, em quantidades significativas foram *p*-cimeno (9,6%) e *p*-metoxitimol (8,4%).

Oliveira et al., (2007) relataram a composição química do OE de *L. organoides* obtido de amostras coletadas em Oriximiná, Pará, Brasil, onde carvacrol foi o componente

principal (38%), seguido de timol (18%) e *p*-cimeno (10%). Em outros estudos, a concentração de carvacrol no OE de *L. origanoides* variou entre 33,5-42,9% (Santos et al., 2004; Stashenko et al., 2010, Sarrazin et al., 2015). O óleo obtido de amostras vegetais coletadas na Venezuela apresentou timol (62%), *p*-cimeno (9%), carvacrol (8%) e γ -terpineno (6%) como principais compostos (Rojas et al., 2006). Por outro lado, Ribeiro et al., (2014) sugerem um novo quimiotipo para *L. origanoides*, caracterizado pela presença de (*E*)-metil cinamato e (*E*)-nerolidol como componentes majoritários. *Lippia schomburgkiana*, uma espécie sinônimo de *L. origanoides*, existente no Maranhão, Brasil, mostrou também outro quimiotipo diferente, com a predominância de 1,8-cineol (Da Silva et al., 2009). Estes dados mostram que o OE de *L. origanoides* apresenta uma variação qualitativa e quantitativa de sua composição química, que são consequências de variações genéticas e/ou influência de condições ambientais existentes nos pontos de amostragem.

4.2. Ensaio de atividade antifúngica do óleo essencial de *L. origanoides* em leveduras do gênero *Candida*

Avaliou-se o espectro de inibição do OE de *L. origanoides* frente a *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Estas cepas apresentaram um elevado grau de sensibilidade ao OE, evidenciado a partir das zonas de inibição em torno dos discos (Tabela 02). Concentrações do OE entre 0,31-1,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (CIM) foram capazes de inibir completamente o crescimento de cepas de levedura, enquanto 0,62-5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (CFM) apresentaram atividade fungicida. Fluconazol, comumente usado contra infecções por leveduras do gênero *Candida*, apresentou valores de CIM entre 0,12-1,05 mg mL^{-1} . Assim, demonstramos que OE de *L. origanoides* apresenta atividade fungistática ou fungicida contra três cepas de *Candida*, e que sua capacidade de reduzir ou eliminar o microorganismo ensaiado depende da concentração.

Tabela 02 - Potencial antifúngico do óleo essencial de *L. origanoides* contra leveduras do gênero *Candida*.

<i>Microorganisms</i>	<i>Óleo essencial de Lippia origanoides</i>			Flu
	DD ^a (10 μL)	CIM ($\mu\text{L mL}^{-1}$)	CFM ($\mu\text{L mL}^{-1}$)	CIM (mg mL^{-1})
<i>C. albicans</i>	44,1 \pm 0,3	0,62	5	1,05
<i>C. tropicalis</i>	30,6 \pm 0,2	1,25	2,5	1,05
<i>C. parapsilosis</i>	24,0 \pm 0,1	0,31	0,62	0,12

^a Diâmetro da zona de inibição decrescimento expresso em milímetros.

DD – disco difusão; CIM – Concentração Inibitória Mínima; CFM – Concentração Fungicida Mínima; Flu – Fluconazol. A inibição de crescimento das leveduras foi revelada pela ausência de redução de resazurina a refazurina.

Fungos são organismos eucarióticos, e por essa razão, eles geralmente apresentam maiores problemas terapêuticos em relação a infecções bacterianas. Em particular, espécies pertencentes ao gênero *Candida* são intrinsecamente resistentes ou rapidamente adquirem resistência a drogas antifúngicas, justificando a busca de novas estratégias terapêuticas (Ahmad et al., 2011). Muitos OE apresentam atividade biológica tanto *in vitro* como *in vivo*, o que tem justificado a pesquisa sobre a medicina tradicional focada na caracterização de sua atividade antimicrobiana (Agarwal et al., 2010). A atividade antifúngica de OE com alta concentração de carvacrol e timol tem sido reportada em espécies do gênero *Candida* (Khan et al., 2015). Santos e colaboradores (2004) e Oliveira e colaboradores (2007) analisaram o potencial antimicrobiano do OE de *L. origanoides*, obtido de amostras coletadas nos Estados do Piauí e Pará no Brasil, respectivamente, e descobriram que o OE desta espécie possui atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, bactérias Gram-negativas e fungos. Os autores atribuíram a atividade antimicrobiana aos principais compostos químicos presentes no OE, carvacrol e timol, porém, a CIM, CFM e as possíveis interações com drogas-padrão não foram determinadas.

O rompimento da integridade da membrana e a intervenção na biossíntese do ergosterol causada por timol e carvacrol tem sido implicada como um modo de ação antimicrobiana contra diferentes espécies de bactérias e leveduras do gênero *Candida* (Ahmad et al., 2011). Timol também é capaz de promover alterações no gradiente eletroquímico de prótons, por interagir diretamente com enzimas responsáveis pela homeostase iônica (Ahmad et al., 2010). Em *S. cerevisiae*, Bennis et al., (2004) demonstraram que a superfície de células tratadas com timol foram significativamente danificadas.

Em concentrações sub-inibitórias, alterações no transcriptoma e proteoma podem revelar como a célula responde a estes compostos, e a regulação de genes envolvidos na biossíntese de determinadas vias metabólicas pode ser indicativo de que estruturas celulares ou processos sejam afetados (Rao et al., 2010).

Fungos também requerem regulação da expressão dos sistemas de defesa antioxidante, não só para proteção contra as respostas de defesa do hospedeiro, mas também para a manutenção da homeostase redox necessária para o crescimento fúngico normal. Assim, a desestabilização dos sistemas de defesa antioxidante pode ser um meio eficaz para o controle de crescimento de patógenos fúngicos (Kim et al., 2011). No presente trabalho, além de avaliarmos a atividade antifúngica do OE de *L. origanoides* por métodos convencionais, apresentamos o efeito quimiosensibilizante de concentrações subinibitórias deste óleo sobre o sistema de defesa antioxidante, usando *S. cerevisiae* como um modelo experimental.

4.3. Efeito do OE de *L. origanoides* sobre o crescimento de *S. cerevisiae*

Este teste foi realizado para determinar as concentrações subinibitórias do OE a serem utilizadas no ensaio de quimiossensibilização. Para isso, células do modelo mutante *S. cerevisiae* $\Delta ycf1$ foram expostas a cinco diferentes concentrações de OE (variando de forma decrescente 5-0,125 $\mu\text{L mL}^{-1}$) e a inibição do crescimento foi mensurada por DO_{600} . A susceptibilidade de *S. cerevisiae* frente ao OE de *L. origanoides* foi comparada a respostas deste microorganismo após exposição ao Cd^{2+} , um conhecido agente indutor de estresse oxidativo (Tabela 03).

Tabela 03 - Efeito do óleo essencial de *Lippia origanoides* (OELO) sobre o crescimento de células do modelo mutante *S. cerevisiae* $\Delta ycf1$

Tratamento OELO $\mu\text{L mL}^{-1}$	^a Crescimento	^b Inibição de crescimento (%)
5	0,23 \pm 0,02 ***	69
2	0,28 \pm 0,09 ***	62
0,5	0,34 \pm 0,04 ***	54
0,25	0,50 \pm 0,05 ***	33
0,125	0,72 \pm 0,15	4
Cd^{2+} [20 μM]	0,34 \pm 0,09 ***	54
Cd^{2+} [10 μM]	0,72 \pm 0,06	4
Tween 80 (0,5%)	0,75 \pm 0,15	0

^a: crescimento celular mensurado por DO_{600} após 3 h de exposição (média \pm DP, $n = 3$).

^b: Percentual de inibição de crescimento em relação às células controle tratadas com Tween 80 (0,5%).

***($p < 0,001$): para comparação entre células tratados com OE e células controle tratadas com Tween 80 (0,5%).

Células não tratadas: $\text{DO}_{600} = 0,84 \pm 0,01$.

A IC_{50} (concentração capaz de inibir 50% do crescimento de microorganismos) do OE de *L. origanoides* sobre o modelo mutante *S. cerevisiae* $\Delta ycf1$ foi determinada em $0,45 \pm 0,05 \mu\text{L mL}^{-1}$, correspondente ao efeito promovido pela exposição deste microorganismo à 20 μM de Cd^{2+} , resultando em 54% de inibição de crescimento. Portanto, o OE de *L. origanoides* exerce significativa atividade antifúngica contra *S. cerevisiae*, estando em consonância com resultados obtidos frente à *Candida* spp.

As concentrações subinibitórias do OE de *L. origanoides* selecionadas foram: 0,25 e 0,125 $\mu\text{L mL}^{-1}$, correspondendo a inibição de crescimento de 33 e 4%, respectivamente, reconhecendo que 4% de inibição de crescimento não representa resultado estatisticamente

significativo quando comparado à células controle tratadas com Tween 80 (0,5%).

4.4. Indução dos genes de resposta ao estresse oxidativo e mutagênico no modelo mutante *S. cerevisiae* $\Delta ycf1$ após exposição ao OE de *L. origanoides*.

O potencial quimiosensibilizante do OE de *L. origanoides* sobre *S. cerevisiae* foi avaliado através da exploração de resposta ao estresse oxidativo e mutagênico, mensurando a expressão dos genes GSH1, KAR2, PRX1 e RNR3. Os efeitos do referido OE foram comparados com os efeitos promovidos pela exposição ao Cd^{2+} , um metal tóxico reconhecido por induzir o estresse oxidativo em leveduras. A mistura OE- Cd^{2+} foi também avaliada com o propósito de verificar se esse OE pode aumentar os efeitos tóxicos do Cd^{2+} e vice versa. Os resultados de expressões relativas dos genes analisados são representados na Tabela 04.

Tabela 04 - Efeitos do óleo essencial de *Lippia origanoides* sobre o sistema de defesa antioxidante e mutagênico, utilizando *S. cerevisiae* $\Delta ycf1$ como modelo experimental.

Tratamento	Expressão relativa de genes			
	<i>GSH1</i>	<i>KAR2</i>	<i>PRX1</i>	<i>RNR3</i>
Controle - Tween 80 (0,5%)	46 ± 2	87 ± 20	43 ± 10	42 ± 7
Cd^{2+} (10 μ M)	22 ± 12	45 ± 34	25 ± 17	32 ± 23
Cd^{2+} (20 μ M)	85 ± 43	229 ± 112	114 ± 55	114 ± 59
EO (0,125 μ L mL ⁻¹)	222 ± 107	312 ± 110	197 ± 56 §	220 ± 71 §
EO (0,125 μ L mL ⁻¹) + Cd^{2+} (10 μ M)	302 ± 48 §	475 ± 84 §	320 ± 63 §	251 ± 48 §
EO (0,125 μ L mL ⁻¹) + Cd^{2+} (20 μ M)	672 ± 183 §	666 ± 65 §	420 ± 83 §	521 ± 112 §
EO (0,25 μ L mL ⁻¹)	218 ± 19 §	181 ± 38	137 ± 48	141 ± 35 §
EO (0,25 μ L mL ⁻¹) + Cd^{2+} (10 μ M)	251 ± 31 §	224 ± 30 §	181 ± 22 §	108 ± 58
EO (0,25 μ L mL ⁻¹) + Cd^{2+} (20 μ M)	283 ± 52 §	443 ± 107 §	264 ± 33 §	318 ± 88 §

O RNA ribossomal 18S foi usado como gene de referência. Todos os valores foram multiplicados por 1000 para facilitar a leitura. Os valores estão expressos como média ± EPM ($n = 3$). § ($p < 0,05$) Diferenças significativas entre os valores de expressão relativa na presença de OE em relação ao controle.

A concentração de 10 μ M Cd^{2+} não exerceu qualquer efeito indutor sobre a expressão dos genes analisados. Ao contrário, a concentração de 20 μ M Cd^{2+} apresenta uma tendência de regulação não significativa para cima. Isto significa que, nessas concentrações, o efeito inibidor de crescimento promovido pelo Cd^{2+} não está relacionado ao desencadeamento de estresse oxidativo. Gardarin et al., (2010) relatam que, em doses baixas, o retículo endoplasmático de leveduras é o principal alvo da toxicidade promovida pelo Cd^{2+} , e que a indução de um estresse oxidativo ocorre provavelmente em doses mais elevadas. Em

concentrações subinibitórias, o OE de *L. origanoides* foi capaz de estimular, de forma significativa, respostas antioxidantes dos genes analisados. Em relação ao controle, os genes PRX1 e RNR3, por exemplo, foram 4 e 5 vezes mais expressos após exposição das células de levedura ao OE de *L. origanoides* na concentração de 0,125 $\mu\text{L mL}^{-1}$, enquanto os genes RNR3 e GSH1 foram 3 e 4 vezes mais expressos após exposição das células de levedura ao OE na concentração de 0,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Isto significa que, nessas concentrações, o OE de *L. origanoides* é capaz de provocar danos oxidativos e mutagênicos, desregulando a expressão de genes de resposta ao estresse oxidativo.

A adição de Cd^{2+} às culturas pré-tratadas com o OE promoveu o aumento da expressão dos genes em estudo. Em presença de ambos os compostos xenobióticos, todos os genes testados foram significativamente expressos em relação a culturas controle (com exceção do RNR3, quando culturas foram pré-tratadas com 0,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de OE, adicionados de 10 $\mu\text{M Cd}^{2+}$). A resposta máxima foi alcançada após exposição das células ao OE na concentração de 0,125 $\mu\text{L mL}^{-1}$ e 20 $\mu\text{M Cd}^{2+}$. Sob tais condições, GSH1, KAR2, PRX1, e RNR3 foram regulados para cima, 14, 7, 9, e 12 vezes, respectivamente.

Em *S. cerevisiae*, o gene GSH1 codifica a primeira enzima que participa da biossíntese da glutatona: γ -glutamilcisteína sintetase (GSH) (Jamieson, 1998). Esta molécula participa do sistema de defesa antioxidante primário não enzimático, e a manutenção da homeostase da GSH é particularmente importante para a proteção da célula contra danos celulares causados por estresse oxidativo (Dormer et al., 2000; Khan et al., 2015). Assim, a expressão do gene GSH1, que foi aumentada 6 e 14 vezes mediante a exposição das células ao OE de *L. origanoides* na concentração de 0,125 $\mu\text{L mL}^{-1}$, adicionadas de 10 ou 20 $\mu\text{M Cd}^{2+}$, respectivamente, é provavelmente uma resposta adaptativa contra o estresse oxidativo promovido por estes xenobióticos.

O gene RNR3 é responsável pela codificação da ribonucleotideo-redutase (RNR), uma enzima que catalisa a redução de ribonucleotídeos a desoxirribonucleotídeos necessários para a síntese de DNA (Elledge et al., 1992). Este gene é reconhecido por ser responsivo à danos ao DNA, incluindo danos oxidativos (Endo-Ichikawa et al., 1995, 1996). Agentes carcinogênicos e genotóxicos, como por exemplo, agentes que promovem a alquilação do DNA, produtos químicos oxidantes e radiação, foram capazes de induzir a expressão RNR3 em doses sub-letais (Jia et al., 2002). O OE de plantas medicinais, por exemplo, promoveu indução significativa do gene RNR3, resposta equivalente a causada pelo peróxido de hidrogênio em doses equitóxicas. A citotoxicidade induzida pelo OE envolveu respostas ao estresse oxidativo, as quais foram evidenciadas pela proteção observada na presença de inibidores de ROS, como a glutatona e catalase (Bakkali et al., 2005). Assim, a expressão do

gene RNR3 aumentada em 5 e 12 vezes mediante a exposição de células ao OE de *L. origanoides* na concentração de 0,125 $\mu\text{L mL}^{-1}$ em presença ou não de 20 μM de Cd^{2+} , indica o efeito mutagênico deste óleo sobre *S. cerevisiae*, provavelmente associado ao desencadeamento de estresse oxidativo.

Peroxirredoxinas (Prx) são enzimas que atuam como antioxidantes redutores de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e hidroperóxidos à água ou o álcool correspondente, respectivamente (Bang et al., 2012). Embora tenham sido descritas recentemente, a importância das peroxirredoxinas para controle do estado oxidativo de células emerge rapidamente (Rabilloud et al., 2002). Em *S. cerevisiae*, as Prx1p estão localizadas nas mitocôndrias e sua expressão é aumentada quando as células utilizam a via respiratória, assim como em resposta a condições de estresse oxidativo (Pedrajas et al., 2000). Em adição, mutações no gene PRX1 sensibilizam as células ao H_2O_2 , ao choque térmico e ao cádmio, de forma dependente de oxigênio (Greetham e Grant, 2009). Assim, o aumento da expressão do gene PRX1, observado em 4 e 9 vezes maior mediante exposição ao OE de *L. origanoides* na concentração de 0,125 $\mu\text{L mL}^{-1}$ sem ou com a adição de 20 μM de Cd^{2+} , respectivamente, indica uma resposta adaptativa ao estresse oxidativo desencadeado em mitocôndrias.

Em leveduras, o gene KAR2 codifica uma chaperona molecular denominada BiP, que pertencem a uma família de proteínas expressas no retículo endoplasmático (RE) de todas as células eucarióticas. Chaperonas BiP estão envolvidos em funções essenciais para a viabilidade celular, tais como translocação de polipeptídios no lúmen do RE, dobramento ou degradação de proteína (Haas, 1994; Simons et al., 1995). KAR2/BiP são importantes sensores de espécies reativas de oxigênio; podem mudar sua atividade quando estes produtos químicos prejudiciais estão presentes e, dessa forma, ajudam a proteger a célula contra danos oxidativos (Wang et al., 2014). Assim, a expressão aumentada do gene KAR2 em 5 e 7 vezes após a exposição de células ao OE de *L. origanoides* na concentração de 0,125 $\mu\text{L mL}^{-1}$, com adição de 10 ou 20 μM de Cd^{2+} , respectivamente, é provavelmente uma resposta adaptativa contra o estresse oxidativo desencadeado no lúmen do RE.

4.5. Quimiossensibilização antifúngica de concentrações sub-inibitórias do OE de *L. origanoides* em associação com Fluconazol frente a leveduras do gênero *Candida*

Uma vez que o uso combinado do OE de *L. origanoides* com o Cd^{2+} promoveu alterações na expressão de genes de resposta ao estresse oxidativo, decidimos avaliar se concentrações sub-inibitórias do OE poderiam aumentar de forma sinérgica a ação antifúngica do azólico comercial Fluconazol. Em leveduras do gênero *Candida*, a exposição a baixas

concentrações do OE de *L. organoides* (0,125 e 0,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$) promoveu redução significativa das concentrações de Fluconazol necessárias para inibir o crescimento destes microorganismos, o que ilustra a capacidade quimiosensibilizante do OE, resultando no aumento da atividade antifúngica de um antifúngico padrão.

Em *C. albicans*, por exemplo, a CIM do Fluconazol em combinação com o OE nas concentrações de 0,125 μl ou 0,25 mL^{-1} reduziu para 0,03 e 0,01 mg mL^{-1} em relação ao seu efeito isolado (CIM = 1,05 mg mL^{-1}) (Tabela 05). Do mesmo modo, frente a *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, ambas as concentrações do OE reduziram a CIM do Fluconazol em 35 e 12 vezes, respectivamente. As concentrações do OE que foram ativas em combinação com Fluconazol não apresentaram qualquer efeito quando testadas isoladamente, exceto frente à *C. parapsilosis* onde o OE na concentração de 0,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$ representou 20% de redução em relação ao valor da CIM.

Tabela 05 - Atividade antifúngica de concentrações sub-inibitórias do OE de *Lippia organoides* em associação com Fluconazol contra *Candida* spp.

<i>Microorganismos</i>	CIM (mg mL^{-1})		
	Flu	Flu + OE 0,125 $\mu\text{L mL}^{-1}$	Flu + OE 0,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$
<i>C. albicans</i>	1,05	0,03	0,01
<i>C. tropicalis</i>	1,05	0,03	0,03
<i>C. parapsilosis</i>	0,12	0,01	0,01

CIM - Concentração Inibitória Mínima; Flu – Fluconazol.

Cada tratamento combinado foi ensaiado em triplicata.

A inibição de crescimento das leveduras foi revelada pela ausência de redução de resazurina a refazurina.

A inibição do crescimento de microorganismos por OE conta com diferentes mecanismos de ação. A morte celular fúngica pode ser mediada tanto por um aumento da permeabilidade iônica da membrana celular, inibição da formação de tubo germinativo ou alterações na biossíntese do ergosterol (Khan et al., 2010). O possível mecanismo de morte celular por indução de estresse oxidativo, caracterizado por níveis elevados de radicais livres (ROS), tem sido identificado (Khan et al., 2011). A atividade anti-*Candida albicans* do OE de *Anethum graveolens* foi relacionada com a indução de ROS endógeno (Chen et al., 2013). A atividade pró-oxidante de OE, ou seus compostos isolados, resultam em danos à biomoléculas, tais como DNA, proteínas e lipídeos, e consequente morte celular (Pedrajas et al., 2000; Aruoma, 2003).

A terapia combinatória, envolvendo metabolitos de planta com drogas antifúngicas comerciais, seria uma abordagem complementar eficaz para o tratamento de

infecções causadas por leveduras do gênero *Candida*, principalmente frente a cepas resistentes a estes medicamentos. Especial atenção tem sido dada a compostos naturais que possuem atividade quimiosensibilizante (Doke et al., 2014). Em *C. albicans*, a exposição a baixas concentrações de carvacrol e timol, por exemplo, promoveu alterações na atividade enzimática e sistemas de defesa não enzimáticos, sugerindo seu potencial como agente indutor de estresse oxidativo (Khan, et al., 2015). Um agente quimiosensibilizante não requer necessariamente um alto grau de potencial antimicrobiano para ser eficaz; sua co-aplicação pode melhorar a eficácia de antifúngicos comerciais, debilitando a capacidade de um agente patogênico em desenvolver resistência. O objetivo do processo de quimiossensibilização, especialmente por uso de compostos naturais, é diminuir os níveis de dosagem de drogas comerciais, com a consequente redução de custos e riscos de efeitos colaterais negativos (Kim et al., 2011; Dzhavakhiya et al., 2012).

Compostos naturais redox-ativos, que desestabilizam o sistema de defesa antioxidante de fungos, poderiam agir como potentes agentes quimiosensibilizantes quando co-aplicados com drogas que promovem estresse oxidativo, tais como anfotericina B (Kim et al., 2011, 2012) e miconazol (Bink et al., 2011). A co-aplicação de alguns fungicidas industriais convencionais (triazóis e estrobilurinas) com determinados ácidos fenólicos ou benzo-análogos, que têm como alvo os sistemas de resposta ao estresse oxidativo celular, aumentou a atividade antifúngica destes fungicidas contra leveduras patogênicas e fungos filamentosos que causam micoses invasivas em humanos ou a deterioração pós-colheita de produtos agrícolas (Dzhavakhiya et al., 2012). Compostos fenólicos naturais com ação sinérgica aumentaram a atividade de drogas antifúngicas comerciais contra cepas de leveduras do gênero *Candida* e *Cryptococcus neoformans* (Faria et al., 2011). Combinações de carvacrol com antifúngicos azólicos apresentaram efeito sinérgico contra o crescimento de *C. albicans*. Por outro lado, a associação entre timol e antifúngicos azólicos não apresentou qualquer interação (Doke et al. 2014).

Os compostos azólicos surgiram como os principais fármacos utilizados no tratamento de infecções por leveduras do gênero *Candida*. Particularmente Fluconazol, que tem como alvo a biossíntese do ergosterol (um lipídeo presente em membranas de fungos) permanece entre as drogas antifúngicas mais utilizadas. No entanto, o uso prolongado de Fluconazol tem contribuído para o desenvolvimento da resistência antifúngica em *C. albicans* e outras espécies (Guo et al., 2009). A utilização de OE como agentes antimicrobianos oferece um baixo risco no desenvolvimento de resistência devido à presença de diferentes compostos químicos que podem atuar através de diferentes mecanismos de ação, e assim prevenir o processo de adaptação (Daferera et al., 2003).

Um crescente número de artigos científicos começaram a aparecer ao longo da última década, mostrando que determinados produtos naturais, relativamente não-tóxicos para os seres humanos, são capazes de potencializar a atividade antifúngica quando co-administrados com um agente antifúngico comercial (Campbell et al., 2012). Neste estudo, utilizando o modelo mutante *S. cerevisiae* $\Delta ycf1$, os resultados da análise da expressão de genes de resposta ao estresse oxidativo apoia a hipótese de que baixas concentrações do OE de *L. origanoides* são capazes de promover a quimiosensibilização antifúngica por indução de estresse oxidativo.

Conclusões

O potencial antifúngico do OE de *L. origanoides* coletado em Santarém, PA-Brasil foi confirmado frente a espécies do gênero *Candida*. Em concentrações sub-inibitórias, este óleo promove a expressão de genes envolvidos no estresse oxidativo, responsáveis pela codificação de proteínas de resistência localizados no citoplasma (GSH1p), mitocôndria (PRX1p), e retículo endoplasmático (KAR2p - BIP), bem como a indução do gene RNR3, expresso em resposta a danos ao DNA. O efeito pró-oxidante deste OE foi potencializado em combinação com Cd^{2+} . Com base em sua propriedade pró-oxidante comprovada, frente à leveduras, o uso combinado do OE de *L. origanoides* com Fluconazol resultou num efeito sinérgico de ação antifúngica contra três diferentes espécies de leveduras do gênero *Candida*. Estes resultados confirmam a potencial utilização do OE de *L. origanoides* como agente quimiosensibilizante, podendo contribuir para melhorar a eficácia de drogas antifúngicas convencionais, reduzindo os efeitos secundários negativos e prevenindo o aparecimento de cepas mutantes resistentes a estes medicamentos.

Referências

- 1 Adams, R.P. Identification of essential oil Components by gas chromatography/mass spectrometry, 4th ed.; Allured Publ. Corp.: Carol Stream, IL, USA, 2007.
- 2 Agarwal, A.K, Rogers, P.D., Baerson, S.R., Jacob, M.R., Barker, K.S., Cleary, J.D., Walker, L.A., Nagle, D.G., Clark, A.M. (2003). Genome-wide expression profiling of the response to polyene, pyrimidine, azole, and echinocandin antifungal agents in *Saccharomyces cerevisiae*. The journal of biological chemistry, 278: 34998-35015.
- 3 Agarwal, V., Lal, P., Pruthi, V. (2010). Effect of plant oils on *Candida albicans*. Journal of Microbiology, Immunology and Infection, 43: 447-451.

- 4 Ahmad, A., Khan, A., Yousuf, S., Khan, L.A., Manzoor, N. (2010). Proton translocating ATPase mediated fungicidal activity of eugenol and thymol. *Fitoterapia*, 31: 1157-1162.
- 5 Ahmad, A., Khan, A., Akhtar, F., Yousuf, S., Xess, I., Khan, L.A., Manzoor, N. (2011). Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 30:41-50.
- 6 Aruoma, O.I. (2003). Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutation Research*, 523: 9-20.
- 7 Barns, S.M.; Lane, D.J.; Sogin, M.L.; Bibeau, C.; Weisburg, W.G. Evolutionary relationships among pathogenic *Candida* species and relatives. *Journal of Bacteriology*, 173: 2250-2255, 1991.
- 8 Bakkali, F., Averbek, S.; Averbek, D., Zhiri, A., Idaomar, M. (2005). Cytotoxicity and gene induction by some essential oils in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation research*, 585: 1-13.
- 9 Bauer, A. W.; Kirby, W. M. M.; Sherris, J.C.; Turck, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45: 493-496, 1966.
- 10 Bennis, S., Chami, F., Chami, N., Bouchikhi, T., Remmal, A. (2004). Surface alteration of *Saccharomyces cerevisiae* induced by thymol and eugenol. *Letters in Applied Microbiology*, 38: 454-458.
- 11 Binder, U. and Lass-Flörl, C. (2011). Epidemiology of invasive fungal infections in the mediterranean area. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 3: e20110016.
- 12 Bink, A., Vandenbosch, D., Coenye, T., Nelis, H., Cammue, B.P.A., Thevissen, K. (2011). Superoxide dismutases are involved in *Candida albicans* biofilm persistence against miconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55: 4033-4037.
- 13 Brennan, R.J. and Schiestl, R.H. Cadmium is an inducer of oxidative stress in yeast. *Mutation Research*, 356: 171-178, 1996.
- 14 Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Carl T. Wittwer, C.T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55:611-622, 2009.
- 15 Campbell, B.C., Chan, K.L., Kim, J.H. (2012). Chemosensitization as a means to

- augment commercial antifungal agents. *Frontiers in Microbiology*, 3: 1-20.
- 16 Chen, Y., Zeng, H., Tian, J., Ban, X., Ma, B., Wang, Y. (2013). Antifungal mechanism of essential oil from *Anethum graveolens* seeds against *Candida albicans*. *Journal of Medical Microbiology*, 62: 1175-1183.
 - 17 Da Silva N.A., Da Silva J.K.R., Andrade E.H.A., Carreira L.M.M., Sousa P.J.C., Maia J.G.S. (2009). Essential oil composition and antioxidant capacity of *Lippia schomburgkiana*. *Natural Product Communications*, 4: 1281-1286.
 - 18 Daferera, D.J., Ziogas, B.N., Polissiou, M.G. (2003). The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium sp.* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop Protection*, 22: 39-44.
 - 19 Doke, S.K., Raut, J.S., Dhawale, S., Karuppayil, S.M. (2014). Sensitization of *Candida albicans* biofilms to fluconazole by terpenoids of plant origin. *Journal of General and Applied Microbiology*, 60: 163-168.
 - 20 Dormer, U.H., Westwater, J., McLaren, N. F., Kenti, N. A., Mellori, J., Jamieson, D. J. (2000). Cadmium-inducible expression of the yeast *GSH1* Gene requires a functional sulfur-amino acid regulatory network. *The Journal of Biological Chemistry*, 275: 32611-32616.
 - 21 Dzhavakhiya, V., Shcherbakova, L., Semina, Y., Zhemchuzhina, N., Campbell, B. (2012). Chemosensitization of plant pathogenic fungi to agricultural fungicides. *Frontiers in Microbiology*, 3: 1-9.
 - 22 Elledge, S.J., Zhou, Z and Allen, J.B. (1992). Ribonucleotide reductase: regulation, regulation, regulation. *TIBS*, 17: 119-123.
 - 23 Endo-Ichikawa, Y., Kohno, H., Tokunaga, R., Taketani, S. (1995). Induction in the gene *RNR3* in *Saccharomyces cerevisiae* upon exposure to different agents related to carcinogenesis. *Biochemical Pharmacology*, 50: 1695-4699.
 - 24 Endo-Ichikawa, Y., Kohno, H., Furukawa, T, Ueda, T., Ogawa, Y., Tokunaga, R., Taketani, S. (1996). Requirement of multiple DNA-protein interactions for inducible expression of *RNR3* gene in *Saccharomyces cerevisiae* in response to DNA damage. *Biochemistry and Biophysical Research Communications*, 222:280-286.
 - 25 Faria, N.C.G., Kim, J.H., Gonçalves, L.A.P., Martins, M.L., Chan, K.L., Campbell, B.C. (2011). Enhanced activity of antifungal drugs using natural phenolics against yeast strains of *Candida* and *Cryptococcus*. *Letters in Applied Microbiology*, 52: 506-513.
 - 26 Gardarin, A., Chédin, S., Lagniel, G., Aude, J.C., Godat, E., Catty, P., Labarre, J. (2010). Endoplasmic reticulum is a major target of cadmium toxicity in yeast. *Molecular Microbiology*, 76:1034-1048.

- 27 Greetham, D. and Grant, C.M. (2009). Antioxidant activity of the yeast mitochondrial one-Cys peroxiredoxin is dependent on thioredoxin reductase and glutathione *in vivo*. *Molecular and Cellular Biology*, 29:3229-3240.
- 28 Guo, N., Liu, J., Wu, X., Bi, X., Meng, R., Wang, X., Xiang, H., Deng, X., Yu, L. (2009). Antifungal activity of thymol against clinical isolates of fluconazole-sensitive and -resistant *Candida albicans*. *Journal of Medical Microbiology*, 58 1074-1079.
- 29 Haas, I.G. (1994). BiP (GRP78), an essential hsp70 resident protein in the endoplasmic reticulum. *Experientia*, 50: 1012-1020.
- 30 Hughes, T.R. (2002). Yeast and drug discovery. *Functional & Integrative Genomics*, 2: 199-211.
- 31 Jia, X.; Zhu, Y.; Xiao, W. A stable and sensitive genotoxic testing system based on DNA damage induced gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research*, 519: 83-92, 2002.
- 32 Jamieson, D.J. (1998). Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14: 1511-1527.
- 33 Khan, A.; Ahmad, A.; Akhtar, F.; Yousuf, S.; Xess, I.; Khan, L.A.; Manzoo, N. *Ocimum sanctum* essential oil and its active principles exert their antifungal activity by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity. *Research in Microbiology*, 161: 816-823, 2010.
- 34 Khan, A.; Ahmad, A.; Akhtar, F.; Yousuf, S.; Xess, I.; Khan, L.A.; Manzoor, N. (2011). Induction of oxidative stress as a possible mechanism of the antifungal action of three phenyl propanoids. *FEMS Yeast Research*, 11: 114-122.
- 35 Khan, A., Ahmad, A., Khan, L.A. Padoa, C.J., van Vuuren, S., Manzoor, N. (2015). Effect of two monoterpene phenols on antioxidant defense system in *Candida albicans*. *Microbial Pathogenesis*, 80: 50-56.
- 36 Kim, J.H., Chan, K.L., Mahoney, N., Campbell, B.C. (2011). Antifungal activity of redox-active benzaldehydes that target cellular antioxidation. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 10: 1-16.
- 37 Kim, J.H., Chan, K.L., Faria, N.C.G., Martins, M.L., Campbell, B.C. (2012). Targeting the oxidative stress response system of fungi with redox-potent chemosensitizing agents. *Frontiers in Microbiology*, 3: 1-11.
- 38 National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast*. Approved Standard, document M27-A2, 2002.
- 39 Oliveira, D.R., Leitão, G.G., Bizzo, H.R., Lopes, D., Alviano, D.S., Alviano, C. S.,

- Leitão, S. G. (2007). Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K. Food Chemistry, 10: 236-240.
- 40 Pedrajas, J.R., Miranda-Vizueté, A., Javanmardy, N., Gustafsson, J-Å., Spyrou, G. (2000). Mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* contain one-conserved cysteine type peroxiredoxin with thioredoxin peroxidase activity. The Journal of Biological Chemistry, 275: 16296-16301.
- 41 Rabilloud, T.; Heller, M.; Gasnier, F.; Luche, S.; Rey, C.; Aebersold, R.; Benahmed, M.; Louisot, P.; Lunardi, J. (2002). Proteomics analysis of cellular response to oxidative stress. Evidence for *in vivo* overoxidation of peroxiredoxins at their active site. The Journal of Biological Chemistry, 277: 19396-19401.
- 42 Rao, A., Zhang, Y., Muend, S., Rao, R. (2010). Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR Pathway. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 54: 5062-5069.
- 43 Ribeiro, A.F., Andrade, E.H.A., Salimena, F.R.G., Maia, J.G.S. (2014). Circadian and seasonal study of the cinnamate chemotype from *Lippia origanoides* Kunth. Biochemical Systematics and Ecology, 55: 249-259.
- 44 Rojas, J., Morales, A., Pasquale, S., Márquez, A., Rondón, M., Imré, M., Veres, K. (2006). Comparative study of the chemical composition of the essential oil of *Lippia oreganoides* collected in two different seasons. Natural Products Communication, 1: 205-207.
- 45 Santos, F.J.B., Lopes, J.A.D., Cito, A.M.G.L., Oliveira, E.H., Lima, S.G., Reis, F.A.M. (2004). Composition and biological activity of essential oil from *Lippia origanoides* HBK. Journal of Essential Oil Research, 16: 504-506.
- 46 Sarrazin, S.L.F., Silva, L.A., Assunção, A.P.F., Oliveira, R.B. Calao, V.Y.P., Silva, R., Stashenko, E.E., Maia, J.G.S., Mourão, R.H.V. (2015). Antimicrobial and seasonal evaluation of the carvacrol-chemotype oil from *Lippia origanoides* Kunth. Molecules, 20: 1860-1871.
- 47 Simons, J.F.; Ferro-Novick, S.; Rose, M.D., Helenius, A. (1995). BiP/Kar2p Serves as a Molecular Chaperone during Carboxypeptidase Y Folding in Yeast. The Journal of Cell Biology, 130: 41-49.
- 48 Stashenko, E.E., Martínez, J.R., Ruíz, C. A., Arias, G., Durán, C., Salgar, W., Cala, M. (2010). *Lippia origanoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. Journal of Separation Science, 33: 93-103.
- 49 Van den Dool, H.; Kratz, P.D.J.A. Generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. Journal of

Chromatography A, 11: 463-471, 1963.

- 50 Wang, J., Pareja, K.A., Kaiser, C.A., Sevier, C.S. (2014). Redox signaling via the molecular chaperone BiP protects cells against endoplasmic reticulum-derived oxidative stress. *eLife*, 3: e03496.

CAPÍTULO IV

***Avaliação antimicrobiana e sazonal do óleo essencial de *Lippia origanoides* Kunth, quimiotipo carvacrol**

Sandra Layse F. Sarrazin¹, Leomara Andrade da Silva², Ana Paula F. de Assunção², Ricardo B. Oliveira², Victor Y. P. Calao², Rodrigo da Silva², Elena E. Stashenko³, José Guilherme S. Maia^{2,4} and Rosa Helena V. Mourão^{1,2}.

Resumo

Este estudo avaliou a influência de variações sazonais sobre o rendimento e composição química do óleo essencial de *Lippia origanoides*, com ocorrência no Médio Rio Amazonas, Brasil, e o impacto sobre seu potencial antimicrobiano. O rendimento médio do OE foi de 1,7% ± 0,2% na estação de chuva e 1,6% ± 0,3% na estação seca. Foram observadas correlações com parâmetros climáticos. Os principais componentes foram carvacrol (chuvoso: 43,5% ± 1,9%; seco: 41,4% ± 2,04%), timol (chuvoso: 10,7% ± 1,1%; seco: 10,6% ± 0,9%), ρ -cimeno (chuvoso, 9,8% ± 0,7%; seco: 10,0% ± 1,4%) e ρ -metoxitimol (chuvoso: 9,6% ± 0,8%; seco: 10,4% ± 1,4%). Verificou-se que o potencial antimicrobiano de *L. origanoides* contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* foi pouco influenciado por mudanças na composição do óleo, decorrentes da variação sazonal. Frente à *S. aureus*, a concentração inibitória mínima (MIC) do óleo foi de 1,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$ ao longo de dez meses. Frente à *E. coli*, os valores de MIC variaram entre 0,15 $\mu\text{L mL}^{-1}$ e 0,31 $\mu\text{L mL}^{-1}$ em diferentes meses do ano. A concentração bactericida mínima (CBM) foi de 2,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ frente a *S. aureus* e 1,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$ frente a *E. coli*. Os resultados sugerem que a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *L. origanoides* permanece inalterada durante o ano inteiro, permitindo seu uso medicinal sem qualquer risco de perda ou ausência dos princípios ativos presentes na planta.

Palavras-chave: *Lippia origanoides*; salvia-de-Marajó; composição química do óleo essencial; variação sazonal; avaliação antimicrobiana.

Abstract

This study evaluated the influence of seasonal variation on the yield and composition of essential oil of *Lippia origanoides* occurring in the Middle Rio Amazonas, Brazil, and the impact on its antimicrobial potential. The average oil yield was $1.7\% \pm 0.2\%$ in the rainy season and $1.6\% \pm 0.3\%$ in the dry season. Some correlations with climatic parameters were observed. The major components were carvacrol (rainy, $43.5\% \pm 1.9\%$; dry, $41.4\% \pm 2.04\%$), thymol (rainy, $10.7\% \pm 1.1\%$; dry, $10.6\% \pm 0.9\%$), p-cymene (rainy, $9.8\% \pm 0.7\%$; dry, $10.0\% \pm 1.4\%$) and p-methoxythymol (rainy, $9.6\% \pm 0.8\%$; dry, $10.4\% \pm 1.4\%$). It was found that the antibacterial activity of *L. origanoides* against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* was little influenced by the changes in oil composition due to seasonal variation. Against *S. aureus*, the oil Minimum Inhibitory Concentration (MIC) value was $1.25 \mu\text{L mL}^{-1}$ over ten months. Against *E. coli*, the oil MIC values ranged from $0.15 \mu\text{L mL}^{-1}$ to $0.31 \mu\text{L mL}^{-1}$ in different months of the year. The Minimum Bactericidal Concentration (MBC) value was $2.5 \mu\text{L mL}^{-1}$ against *S. aureus* and $1.25 \mu\text{L mL}^{-1}$ against *E. coli*. The results suggest that the antimicrobial activity identified in the oil remain unchanged for the full year, allowing its medicinal use without any risk of loss or absence of the active principles of the plant.

Keywords: *Lippia origanoides*; Verbenaceae; salva-do-marajó; essential oil composition; seasonal variation; antimicrobial evaluation

* Versão em português do artigo publicado na revista *Molecules*. DOI: 10.3390/molecules20021860. Parte da Tese de Doutorado da primeira autora, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da rede BIONORTE. ¹ Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal, Universidade Federal do Amazonas, 60077-000 Manaus, Brasil. ² Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia, Universidade Federal do Oeste do Pará, 68135-110 Santarém, Brasil. ³ Laboratório de Cromatografia, Centro de pesquisas em Biomoléculas, Universidade industrial de Santander, Bucaramanga 57, Colombia. ⁴ Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Federal do Pará, 66075-110 Belém, Brasil.

1. Introdução

Lippia origanoides Kunth, conhecida no norte do Brasil como "salvia-de-Marajó" e "alecrim-d'angola", é uma espécie arbustiva com um ciclo de vida perene, cujas partes aéreas são usadas na culinária como aromatizante de pratos regionais, e na medicina tradicional para o tratamento de distúrbios gastrointestinais, doenças respiratórias ou como antisséptico para a boca e garganta. No México, esta espécie é também conhecida como orégano e é usada como substituto de *L. graveolens* Kunth e *Origanum vulgare* L., o orégano mexicano e grego, respectivamente [3].

A produção dos componentes químicos em espécies vegetais é influenciada por fatores externos, tais como a qualidade do solo e condições climáticas. Assim, tanto o rendimento quanto a composição química de óleos essenciais são suscetíveis a variações quantitativas e qualitativas e, conseqüentemente, sua atividade biológica, que é dependente de sua composição, está também sujeita a variações em seu potencial [4,5]. Portanto, plantas coletadas em diferentes estações do ano podem apresentar diferentes composições e, conseqüentemente, conter ou não constituintes bioativos específicos [6].

A composição do óleo essencial de *L. origanoides* com ocorrência na Amazônia brasileira e colombiana mostrou variação significativa com base em seus principais constituintes. Como já mencionado, esta espécie é representada por diferentes quimiotipos: ρ -cimeno, e β -felandreno α - e limoneno (quimiotipo A) [7], carvacrol (quimiotipo B) [2,3], timol (quimiotipo C) [7, 8], 1,8-cineol (quimiotipo D) [9], e (*E*)-metil cinamato e (*E*)-nerolidol (quimiotipo E) [10].

A bioatividade do óleo essencial extraído de *L. origanoides* foi avaliada previamente. Este óleo mostrou atividade antimicrobiana contra microorganismos patogênicos [2,3,11-14], atividade repelente contra pragas que destroem grãos armazenados, como *Sitophilus zeamais* e *Tribolium castaneum* [15,16], efeito inibitório sobre a replicação do vírus da febre amarela [17], atividade antiprotozoário contra *Leishmania chagasi* e *Trypanosoma cruzi* [18,19] e proteção contra os efeitos genotóxicos ao DNA induzida por bleomicina [20]. A composição do óleo essencial de *L. origanoides* e sua atividade antioxidante também foram analisados após o cultivo desta espécie sob condições de fertilização orgânica e mineral [21]. Assim, a bioatividade conferida ao óleo essencial de *L. origanoides* possibilita sua utilização como alternativa eficaz no controle de doenças infecciosas, além de outras propriedades de interesse significativo para o mercado de produtos alimentícios e cosméticos.

O presente estudo investigou, no decorrer de um ano, a influência da variação

sazonal sobre o rendimento e composição química do óleo essencial de folhas frescas e ramos finos de *L. origanoides* com ocorrência no município de Santarém, Estado do Pará, Brasil, bem como possíveis variações do potencial antimicrobiano deste óleo, a fim de obter informações que possibilitem sua melhor utilização para fins comerciais.

2. Resultados e Discussão

2.1. Efeito da variação sazonal sobre o rendimento do óleo essencial

Para verificar possíveis influências da variação sazonal sobre o rendimento (%) do óleo essencial de *L. origanoides*, parâmetros como temperatura, radiação solar, precipitação e umidade relativa do ar foram mensurados simultaneamente ao período de coleta. Os resultados são mostrados na Figura 01.

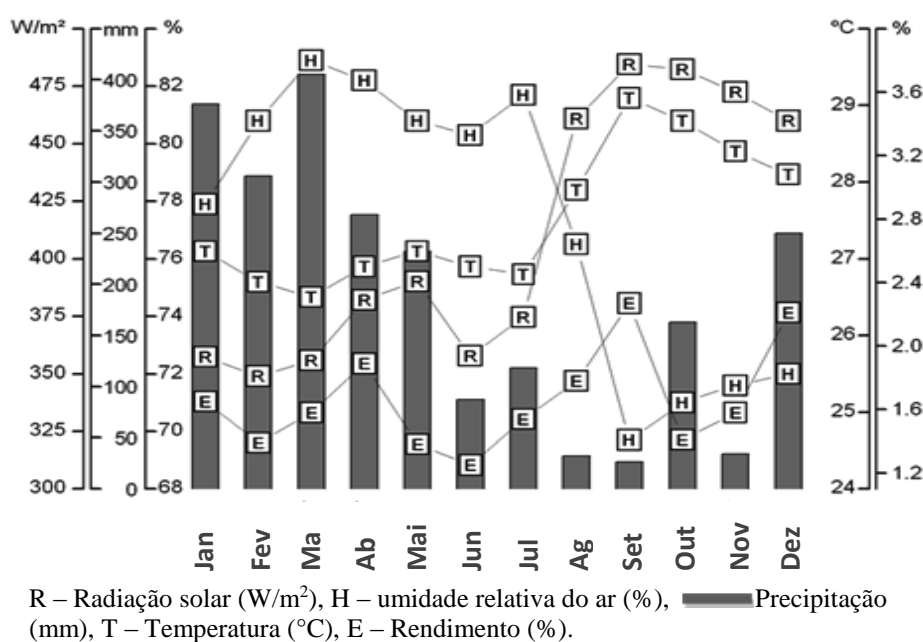


Figura 01. Rendimento (%) do óleo essencial de *Lippia origanoides* e variáveis climáticas mensuradas no momento da coleta: precipitação (mm); radiação solar (W/m²); umidade relativa do ar (%) e temperatura (°C).

A região Norte do Brasil é caracterizada por duas estações climáticas distintas: a estação das chuvas, entre dezembro e maio, e a estação seca, entre junho e novembro. No ano de 2012, os valores médios de temperatura e radiação solar, entre janeiro e dezembro, variaram de 26,44 °C a 29,06 °C e 357,86 W/m² a 484,59 W/m², respectivamente. A umidade relativa do ar e a precipitação variaram de 69,69% a 82,88% e 26,2 mm a 405,3 mm, respectivamente. A precipitação observada em janeiro, fevereiro e março, foi maior quando

comparada aos demais meses do ano. Por outro lado, a temperatura manteve-se quase constante, com valor mínimo em Março (26,44 °C) e máximo em Setembro (29,06 °C).

O rendimento em óleo essencial variou entre 1,3% e 2,3% no decorrer de doze meses de extração, com média de $1,7\% \pm 0,2\%$ na estação chuvosa e $1,6\% \pm 0,3\%$ na estação seca. Portanto, nenhuma diferença estatística foi observada em termos de rendimento em óleo obtido entre as estações do ano ($p > 0,05$). Estes resultados são consistentes com estudos publicados pela Rojas e colaboradores [8], que também observaram um rendimento médio de 1,1% para o óleo de *L. origanoides* com ocorrência em Mérida, Venezuela, em ambas as estações. Neste estudo, as correlações foram observadas ao se comparar os valores de rendimento em óleo e os parâmetros climáticos mensurados durante o período de coleta da planta. O rendimento médio foi diretamente proporcional ao aumento da radiação solar e da temperatura e inversamente proporcional à taxa de umidade relativa do ar (ver Tabela 01). De acordo com Castelo e colaboradores [22], óleos essenciais desempenham um papel importante na defesa das plantas contra condições ambientais adversas. Segundo os autores, temperaturas elevadas podem promover mudanças na atividade de estômatos foliares, reduzindo assim a volatilização destes óleos.

Tabela 01. Correlação entre o rendimento do óleo essencial de *Lippia origanoides* e parâmetros climáticos mensurados na área de coleta da planta: radiação solar, temperatura e umidade relativa do ar.

Fatores ambientais	Coefficiente de correlação (r^2)
Temperatura (°C)	0,49*
Umidade relativa do ar (%)	-0,49*
Radiação (W/m ²)	0,51**

*Significante em $p \leq 0,1$; ** Significante em $p \leq 0,05$.

2.2. Efeito da variação sazonal na composição química do óleo essencial

Os óleos extraídos de plantas coletadas no período compreendido entre janeiro e dezembro de 2012 foram analisados por CG e CG-EM. Os componentes individuais foram identificados por comparação de ambos os dados de espectrometria de massas e índice de retenção de compostos autênticos, os quais foram anteriormente analisados e armazenados no sistema de dados, bem como com o auxílio de bibliotecas comerciais, contendo índices de retenção e espectros de massas de compostos voláteis facilmente encontrados em óleos essenciais [23,24]. Os componentes identificados estão listados na Tabela 02.

Tabela 02. Rendimento e composição química do óleo essencial de *Lippia origanoides* obtido de amostras coletadas de Janeiro a Dezembro de 2012.

Mês/Rendimento em óleo			Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
			1,7 *	1,4 *	1,6 *	1,9 *	1,4 *	1,3 *	1,5	1,8	2,3	1,4	1,6 *	2,2 *
Constituintes	RI _{Calc.}	RI _{Lit.}	Óleo%											
(Z)-Hexen-3-ol	854	859	-	0,2	0,4	-	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	-	-	0,3
α-Tujeno	926	924	0,7	0,6	0,7	0,7	0,5	0,6	0,8	0,7	0,7	0,8	0,9	0,6
α-Pineno	934	932	0,6	0,4	0,4	0,4	0,3	0,4	0,4	0,5	0,5	0,6	0,7	0,5
1-Octen-3-ol	976	974	0,1	0,2	0,3	0,1	0,3	0,1	0,2	0,2	-	-	-	-
β-Pineno	978	976	0,2	0,2	0,1	-	0,1	-	-	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2
Mirceno	990	988	1,3	1,2	1,3	1,3	1,0	1,1	1,2	1,1	1,2	1,5	1,5	1,1
α-Terpineno	1016	1014	0,7	0,8	0,9	0,9	0,7	0,5	0,7	0,7	0,5	0,7	0,8	0,7
p-Cimeno	1025	1020	11,2	9,6	10,5	10,2	8,5	9,7	9,6	7,9	9,5	11,8	11,5	8,9
Limoneno	1026	1024	0,3	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2
1,8-Cineol	1032	1026	0,9	0,9	0,9	0,7	0,8	1,3	0,7	0,6	1,0	0,8	1,1	0,9
γ-Terpineno	1056	1054	1,3	2,0	1,6	1,7	1,7	0,2	1,7	1,5	0,1	1,9	1,1	0,8
Linalol	1098	1095	3,9	3,8	3,5	2,8	3,7	2,9	2,8	2,9	2,5	2,4	3,1	2,6
Ipsdienol	1144	1140	0,2	0,2	-	-	0,1	-	-	0,1	-	-	-	-
Umbellulona	1169	1167	0,1	0,3	0,2	0,3	0,3	0,3	0,4	0,5	0,1		0,3	0,3
Terpinen-4-ol	1176	1174	1,1	1,1	1,3	0,9	1,1	1	0,9	0,9	0,8	1,0	0,9	0,7
Timol metil eter	1234	1232	2,2	2	1,8	1,4	1,7	1,3	1,6	2,0	1,4	2,1	1,8	1,3
Isômero do Timol (MW=150)	1282	-	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	-	-	-	-	-
Timol	1292	1289	9,0	10,3	12,5	11,7	11,7	12,8	11,8	11,5	9,8	9,3	8,2	9,2
Carvacrol	1299	1298	40,7	43,4	46,4	46,6	45,5	47,2	46,1	40,5	37,7	41,2	35,9	38,3
Timol acetato	1351	1349	0,8	0,8	0,4	0,3	0,5	0,4	0,6	0,7	0,6	0,6	0,9	0,6
Carvacrol acetato	1372	1370	1,7	1,6	0,6	0,6	0,8	0,6	1,1	1,3	0,9	1,1	1,8	1,1
Geranyl acetato	1382	1379	0,4	0,4	0,3	0,3	0,4	0,6	0,4	0,6	0,6	0,5	0,7	0,8
(E)-Cariofileno	1418	1416	3,4	3,5	2,5	2,6	3,4	2,3	2,1	2,8	2,7	2,9	4,8	4,6
<i>trans</i> -α-Bergamoteno	1434	1432	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2		0,2	0,2
α-Humuleno	1455	1452	0,4	0,4	0,3	0,3	0,4	0,3	0,2	0,3	0,3	0,3	0,5	0,5
p-Metoxitimol	1487	1484	8,8	8,4	7,3	10,1	8,8	7,4	8,4	10,1	12,8	10,4	13,3	14,1
β-Bisaboleno	1506	1505	0,3	0,4	0,3	0,3	0,4	0,3	0,2	0,4	0,4	0,3	0,4	0,5
(Z)-α-Bisaboleno	1508	1506	-	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	-	0,3	0,4	0,6	0,5	0,3
δ-Cadineno	1524	1522	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-	0,2	0,2
<i>trans</i> -γ-Bisaboleno	1531	1529	0,4	0,5	0,4	0,5	0,6	-	0,5	-	-	-	-	0,7
<i>p</i> -Metoxycarvacrol (tent.)	1555	-	2,8	2,5	1,1	1,2	1,6	1,3	1,6	2,3	2,7	2	3,7	3,1
Oxido de Cariofileno	1584	1582	3	1,8	1,3	1,6	1,7	1,6	2,2	2,8	2,8	3,6	2	1,9
2-feniletil tiglato	1587	1584	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,2	0,3	-
Epóxido de Humuleno II	1611	1608	-	-	-	-	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	-	-	-
α-Cadinol	1655	1652	0,2	-	-	-	0,1	-	-	0,1	0,1	-	0,2	0,2
α-Eudesmol	1656	1653	-	-	-	-	0,1	0,1	-	0,1	0,2	-	0,2	0,2
α-Bisabolol	1686	1685	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	-	0,2	0,3
Sesquiterpenos não identificados	-	-	2,1	0,5	0,8	0,5	0,7	1,2	1,3	3,7	3,8	2,1	1,4	2,5
Total	-	-	97,8	99,0	98,8	99,0	98,7	96,1	97,7	93,1	92,0	96,1	98,2	95,9

IR_{Calc} = Índice de Retenção calculado em coluna DB-5ms; IR_{Lit} = Índice de Retenção da literatura (Adams, 2007)

[23]. *Período de floração

Trinta e sete constituintes foram identificados entre as doze amostras de óleos analisados, representando uma média de 92% a 99% do total. De acordo com o período sazonal, os principais constituintes foram carvacrol (estação chuvosa, 43,5% ± 1,9%, estação seca, 41,4% ± 2,04%, $p < 0,05$), timol (estação chuvosa, 10,7% ± 1,1%, estação seca, 10,6% ± 0,9%, $p > 0,05$), ρ -cimeno (estação chuvosa 9,8% ± 0,7%, estação seca, 10,0% ± 1,4%, $p > 0,05$) e ρ -metoxitimol (estação chuvosa 9,6% ± 0,8%, estação seca, 10,4% ± 1,4%, $p < 0,05$).

A concentração de carvacrol, principal constituinte presente nos óleos obtidos em ambos os períodos sazonais, apresentou pequena diferença, aproximadamente 2%, sem significância estatística. Em abril, a soma dos principais componentes (carvacrol, timol, ρ -cimeno e ρ -metoxitimol) representou 78,6% do total de compostos identificados. Alguns componentes com baixo percentual mostraram-se presentes ou ausentes de acordo com o mês de coleta. Um maior número de componentes foi identificado no óleo obtido de amostras coletadas no mês de maio de 2012.

Diferenças na composição química de óleos essenciais sob a influência do estágio fenológico ou fatores ambientais têm sido relatadas. Por exemplo, em espécies pertencentes ao gênero *Satureja*, com ocorrência na região do Mediterrâneo, carvacrol apresentou-se como principal componente durante o período de floração, e timol na maior parte do ano, exceto no inverno, onde γ -terpinene mostrou predominância [25]. Deste modo, a fase fenológica e fatores ambientais podem influenciar de maneira significativa as vias bioquímicas e processos fisiológicos que alteram o metabolismo da planta e, por conseguinte, a biossíntese de óleo essencial [26,27].

O gênero *Lippia*, com mais de cinquenta óleos essenciais relatados, é bem conhecido por seu caráter aromático [1,28]. Além disso, espécies pertencentes a este gênero, com ocorrência no Brasil, demonstram ampla variação na composição química de seus óleos essenciais, onde uma única espécie pode apresentar diferentes quimiotipos, tais como *Lippia alba* (Mill.) NE Br, coletadas no Pará e Ceará, representam os tipos citral, carvona e 1,8-cineol [29,30]; *Lippia lupulina* Cham., com ocorrência no estado de Mato Grosso, representam os tipos terpinen-4-ol, 1,8-cineol + β -cariofileno, e germacreno D + β -cariofileno + biciclogermacreno [31]; *Lippia grandis* Schauer com ocorrência em toda a região amazônica, representam os tipos timol, 1,8-cineol e carvacrol [32,33]; e *Lippia glandulosa* Schauer com ocorrência em Roraima, com os tipos timol e β -cariofileno [34].

É importante notar que espécimes de *Lippia origanoides* distribuídos entre as Américas Central e do Sul apresentam diferentes quimiotipos. O cheiro de orégano e o predomínio do carvacrol no óleo essencial em estudo assemelha-se a outros espécimes identificados no Piauí e Pará, Brasil, bem como em Santander, Colômbia [2,3,7]. Também

com cheiro de orégano, o quimiotipo timol foi encontrado em Mérida, Venezuela, e nas regiões de Cauca, Nariño e Boyacá, na Colômbia [7,8]. Outro tipo com aroma cítrico e conteúdo significativo de α - e β -felandreno, ρ -cimeno, limoneno e 1,8-cineol foi também encontrado na região de Santander, Colômbia [7]. No Maranhão, um exemplar de *Lippia schomburgkiana*, espécie sinónmia de *L. organoides*, apresentou intenso aroma de canfora e um quimiotipo diferente, com predominância de 1,8-cineol [9]. Recentemente, o óleo essencial de *L. organoides*, com ocorrência no sul do estado do Pará, apresentando odor frutado-lenhoso e uma reminiscência de canela, morango e madeira, foi reportado [10]. Os principais constituintes encontrados neste óleo foram (*E*)-metil cinamato, (*E*)-nerolidol, ρ -cimeno, 1,8-cineol, carvacrol, α -pineno, (*E*)-cariofileno e γ -terpineno, mostrando uma variação significativa de sua composição química ao longo do dia e do ano. Os autores sugeriram que as condições ambientais de clima e o tipo de solo, que nesta região é rico em minério de ferro e manganês, podem estar contribuindo para essa notável variação circadiana e sazonal observada na composição química do óleo essencial. Vale ressaltar que a temperatura e umidade relativa do ar também são mais baixas no sul do Estado do Pará. Por outro lado, no exemplar de *L. organoides* coletado no Oeste do estado do Pará, a composição química do óleo essencial não apresentou variação significativa no decorrer de um ano de coleta, o que também pode ser atribuído às condições ambientais do clima e tipo de solo, que nesta região é pobre em nutrientes minerais. A temperatura e umidade relativa do ar são mais elevadas na região oeste do Estado do Pará.

2.3. Atividade antimicrobiana do óleo essencial

A atividade antimicrobiana do óleo essencial de *L. organoides* frente à *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* foi anteriormente relatada [2,3]. No presente estudo, com os mesmos microorganismos, verificou-se que a atividade antimicrobiana de *L. organoides* foi pouco influenciada por pequenas diferenças na composição química do óleo essencial, decorrentes da variação sazonal. Para ambas as bactérias, diferentes valores de CIM foram obtidos nos 12 meses de coleta de dados. Como observado na Tabela 03, frente à *S. aureus*, o valor de CIM foi de 1,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$ para os óleos obtidos no decorrer de 10 meses de estudo, com exceção dos meses de março e maio, onde o valor CIM foi de 2,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Frente à *E. coli*, o valor de CIM foi de 0,15 $\mu\text{L mL}^{-1}$ em março, maio, junho, julho, setembro e outubro, e 0,31 $\mu\text{L mL}^{-1}$ em janeiro, fevereiro, abril, agosto, novembro e dezembro. Em todas as amostras, os valores CBM foram de 2,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$ e 1,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$ frente à *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente.

Tabela 03. Potencial antimicrobiano do óleo essencial de *Lippia origanoides* obtidos no estudo sazonal (Janeiro a Dezembro de 2012).

Microorganismos	Concentração ($\mu\text{L mL}^{-1}$)												
	Jan	Fev	Mar	Apr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	
CIM	<i>Staphylococcus aureus</i>	1,25	1,25	2,25	1,25	2,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25
	<i>Escherichia coli</i>	0,31	0,31	0,15	0,31	0,15	0,15	0,15	0,31	0,15	0,15	0,31	0,31
CBM	<i>Staphylococcus aureus</i>	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25
	<i>Escherichia coli</i>	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25

Estudos confirmaram a influência dos fatores ambientais como determinantes da ação antimicrobiana dos óleos essenciais [35]. No presente trabalho, não foram observadas variações significativas na atividade antimicrobiana em relação ao período de coleta sazonal da planta. Apenas uma fraca correlação foi detectada após a análise dos valores obtidos nos ensaios de atividade antimicrobiana em relação ao conteúdo percentual dos principais componentes presentes nos óleos obtidos durante o estudo sazonal. Os resultados estão representados na Tabela 04.

Tabela 04. Correlação simples entre a atividade antimicrobiana e os principais constituintes (carvacrol e timol) presentes no óleo essencial de *Lippia origanoides*.

Microorganismo (CIM)	Coeficiente de Correlação (r^2)	
	Carvacrol (%)	Timol (%)
<i>Escherichia coli</i>	-0,411 *	-0,455 *
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,413 *	0,442 *

* Significante em $p \leq 0,1$

A atividade antimicrobiana do óleo essencial de *L. origanoides*, pelo menos em parte, deve ser associada à presença de seus componentes majoritários, carvacrol e timol [3,36]. Estes compostos exibem elevada atividade antimicrobiana contra diferentes tipos de microorganismos e têm sido frequentemente estudados neste contexto. Ultee e colaboradores [37] apresentaram a hipótese de que o grupo hidroxila e a presença de um sistema de deslocamento de elétrons são importantes para a atividade antimicrobiana de compostos fenólicos, tais como o carvacrol e timol. Além disso, Ben Arja e colaboradores [38] suportam a hipótese de que o próton do grupo hidroxila, quando livre, é capaz de ser distribuído para o

sistema eletrônico do anel aromático, aumentando o carácter hidrofóbico destes compostos, permitindo sua acumulação nas membranas celulares, causando conseqüente desintegração e morte dos microorganismos. Quanto a esta ação biológica, é evidente que não se pode excluir o efeito sinérgico dos componentes de importância secundária no óleo essencial.

Assim, com base nos resultados do estudo sazonal, o bom rendimento dos óleos analisados, e as pequenas variações observadas no conteúdo de carvacrol e timol, pode-se sugerir que a atividade antimicrobiana conferida ao óleo essencial de *L. origanoides* com ocorrência em Santarém, Pará, permanecerá inalterada, independente do período de coleta, permitindo a sua utilização para fins medicinais sem qualquer risco de perda ou ausência de um dos princípios ativos da planta.

3. Seção experimental

3.1. Material vegetal

Folhas e ramos finos (partes aéreas) de *L. origanoides* foram coletados mensalmente de janeiro a dezembro de 2012. A coleta das amostras foi realizada em um plantio experimental pertencente à Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), identificado como "Projeto Farmácia Viva" e localizado às margens da Rodovia Everaldo Martins, PA 457, Km 26, município de Santarém, Pará, médio rio Amazonas, Brasil. O material vegetal foi obtido de amostras clones vizinhas, que apresentavam-se em mesma fase de crescimento, a fim de minimizar a influência da fenologia e dos efeitos de intensidade da luz, composição do solo e de outros fatores ambientais. A posição geográfica intermediária entre os espécimes foi determinada em aparelho GPS, resultando nas coordenadas 02 ° 30'870 "S e 54 ° 56'416"W, a uma altitude de aproximadamente 52 m acima do nível do mar. Todas as coletas foram realizadas no período da manhã, entre oito e dez horas. Parte do material obtido (180 g) foi seco em estufa com circulação de ar forçada (40 °C) até obtenção de massa constante, cujos valores foram utilizados para o cálculo do rendimento em óleo essencial. Exemplares foram depositados no herbário da Embrapa Amazônia Oriental (IAN-184688), cidade de Belém, Pará, Brasil, e no do herbário da Universidade Federal de Juiz de Fora (CESJ-64029), Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil.

3.2. Dados climáticos

Fatores climáticos como temperatura, radiação solar, umidade relativa do ar e precipitação foram medidos mensalmente de janeiro a dezembro de 2012. Os dados foram obtidos a partir de uma estação meteorológica instalada perto do plantio experimental. O equipamento utilizado foi: Datalogger modelo CR1000 (Campbell, North Logan, Utah, EUA); Termo-higrômetro modelo HMP45C (Vaisala, Ventura, Califórnia, EUA); Piranômetro modelo LI200 (LI-COR, Lincoln, Nebraska, EUA) e um Pluviômetro Modelo TR-525 (Texas eletrônicos, Dallas, Texas, EUA).

3.3. Processamento da planta e extração do óleo essencial

Partes aéreas de *L. origanoides* (folhas e ramos finos) foram coletados, secos à temperatura ambiente e submetidos ao processo de hidrodestilação, utilizando um aparelho do tipo Clevenger (180 g, 3 h). Os óleos obtidos foram secos em sulfato de sódio anidro, e os seus conteúdos percentuais foram calculados com base no peso seco da planta. O procedimento foi realizado em triplicata.

3.4. Análise da composição do óleo

A análise da composição química do óleo essencial foi realizada em equipamento Agilent Tecnologia (Santa Clara, Califórnia, EUA) consistindo de um Plus Series CG 6890 acoplado a um detector seletivo de massas 5973 e um amostrador automático 7863, sob as seguintes condições: coluna capilar de sílica fundida DB-5 ms (espessura da película de 60 m \times 0,25 mm); temperatura programada a 50 °C (5 min em modo isotérmico), 150 °C (4 °C / min + 2 min em modo isotérmico), 250 °C (5 °C / min + 5 min em modo isotérmico), 275 °C (10 °C / min, mais 15 min em modo isotérmico); temperatura do injetor de 250 °C, injeção tipo *split* (1 μ L) fluxo ajustado para se obter a proporção 30:1. Hélio foi utilizado como gás de arraste, com pressão de entrada de 16,5 psi. Os espectros de massa foram obtidos por impacto eletrônico a 70 eV de energia; as temperaturas da fonte de ionização e linha de transferência foram mantidas a 230 e 285 °C, respectivamente. Os dados quantitativos sobre os constituintes voláteis foram obtidos por normalização de área de pico, utilizando um CG 6890 Plus Series acoplado ao detector FID, operado sob condições semelhantes ao sistema de CG-EM. O índice de retenção foi calculado para todos os componentes voláteis, utilizando uma série homóloga de n-alcanos (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), em C8-C30, de acordo com a equação linear de Van den Dool e Kratz [39].

3.5. Ensaio antimicrobiano

3.5.1. *Microorganismos e padronização do inóculo*

A avaliação de possíveis variações do potencial antimicrobiano do óleo essencial de *L. origanoides* em decorrência de variações sazonais foi realizada pelo método de microdiluição em caldo [40]. Para isso, foram utilizadas duas cepas de microorganismos: *Escherichia coli* ATCC 25922 (Gram-negativa) e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Gram-positiva).

Os microrganismos foram obtidos comercialmente na forma liofilizada e rehidratados em caldo nutriente (Becton / Difco, Franklin Lakes, New Jersey, EUA) (24 h, 36 ± 2 °C). Após o período de incubação, inóculos foram padronizados de acordo com a escala 0,5 de MacFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹) e posteriormente semeados em placas de Petri contendo ágar de Mueller Hinton (Becton / Difco, Franklin Lakes, New Jersey, EUA) (24 h, 36 ± 2 °C).

3.5.2. *Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)*

Neste método, o inóculo padronizado de acordo com a escala 0,5 de MacFarland foi submetido a diluições em série (solução salina), para obtenção da concentração final de $1,5 \times 10^4$ UFC mL⁻¹. A diluição do óleo essencial foi realizada em solução Tween 80 (1%) para obtenção da concentração inicial de ensaio (20 µL mL⁻¹). As demais concentrações foram obtidas a partir de diluições seriadas em caldo Mueller-Hinton (Becton / Difco, Franklin Lakes, New Jersey, EUA). Os testes foram realizados em placas de 96 poços, onde cada poço recebeu 90 µL da concentração específica do óleo essencial, 90 µL de caldo Mueller Hinton e 20 µL do inóculo. As culturas foram incubadas por 24 horas em temperatura de 36 ± 2 °C. O controle do crescimento microbiano, controle de esterilidade do meio e controle de ação do solvente foram realizados simultaneamente. Cada poço comportou volume final de 200 µL. A inibição do crescimento de bactérias foi revelada após adição da solução estéril de resazurina (20 µL, 0,02%, p/v) (Vetec, São Paulo, Brasil), e reincubação por 3 horas a 36 ± 2 °C. A CIM, definida como a menor concentração do óleo essencial capaz de inibir o crescimento de microorganismos, foi determinada pela permanência de coloração azul (coloração inicial da resazurina). Os poços que não mostraram crescimento aparente foram selecionados para avaliação da CBM, que foi determinada pela ausência de crescimento

microbiano sobre placas contendo ágar MH [40].

3.6. Análises estatísticas

Os parâmetros climáticos, o rendimento e atividade antimicrobiana foram expressos como média \pm desvio padrão. A significância estatística foi avaliada pelo teste de Tukey, considerando como significativos valores de $p \leq 0,05$ (software GraphPad Prism, versão 3.0, 2009, La Jolla, Califórnia, EUA). Os coeficientes de correlação de Pearson foram calculados usando o software Minitab (versão 14, de 2011, State College, Pensilvânia, EUA) para determinar a relação entre os parâmetros analisados.

4. Conclusões

Os resultados demonstram que a variação sazonal ocorrida durante os 12 meses de coleta não alterou o rendimento médio do óleo essencial de *L. organoides*, e tem pouca influência sobre sua composição química e potencial antimicrobiano. Assim, as informações obtidas durante o curso deste estudo ampliam o conhecimento a cerca desta espécie com potencial medicinal significativo, fornecendo dados científicos que podem ser de grande interesse para futuros fins comerciais.

Referências

1. Pascual, M.E.; Slowing, K.; Carretero, E.; Mata, D.S.; Villar, A. *Lippia*: Traditional uses, chemistry and pharmacology: A review. *J. Ethnopharmacol.* **2001**, *76*, 201-214.
2. Santos, F.J.B.; Lopes, J.A.D.; Cito, A.M.G.L.; Oliveira, E.H.; Lima, S.G.; Reis, F.A.M. Composition and biological activity of essential oil from *Lippia organoides* HBK. *J. Essent. Oil Res.* **2004**, *16*, 504–506.
3. Oliveira, D.R.; Leitão, G.G.; Bizzo, H.R.; Lopes, D.; Alviano, D.S.; Alviano, C.S.; Leitão, S.G. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia organoides* H.B.K. *Food Chem.* **2007**, *101*, 236-240.
4. Viljoen, A.; van Vuuren, S.; Ernst, E.; Klepser, M.; Demirci, B.; Başer, H.; van Wyk, B.-E. *Osmitopsis asteriscoides* (Asteraceae) - The antimicrobial activity and essential oil composition of a Cape-Dutch remedy. *J. Ethnopharmacol.* **2003**, *88*, 137-143.

5. Andrade, E.H.A.; Alves, C.N.; Guimarães, E.F.; Carreira, L.M.M.; Maia, J.G.S. Variability in essential oil composition of *Piper dilatatum* L.C. Rich. *Biochem. Syst. Ecol.* **2011**, *39*, 669-675.
6. Hussain, A.I.; Anwar, F.; Nigam, P.S.; Ashraf, M.; Gilani, A.H. Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four *Mentha* species. *J. Sci. Food Agric.* **2010**, *90*, 1827-1836.
7. Stashenko, E.E.; Martínez, J.R.; Ruíz, C.A.; Arias, G.; Durán, C.; Salgar, W.; Cala, M. *Lippia origanoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. *J. Sep. Sci.* **2010**, *33*, 93-103.
8. Rojas, J.; Morales, A.; Pascuale, S.; Márquez, A.; Rondon, R.; Mathé, I.; Verés, K. Comparative study of the chemical composition of the essential oil of *Lippia origanoides* collected in two different seasons of the year in Venezuela. *Nat. Prod. Commun.* **2006**, *1*, 205-207.
9. Silva, N.A.; da Silva, J.K.R.; Andrade, E.H.A.; Carreira, L.M.M.; Sousa, P.J.C.; Maia, J.G.S. Essential oil composition and antioxidant capacity of *Lippia schomburgkiana*. *Nat. Prod. Commun.* **2009**, *4*, 1281-1286.
10. Ribeiro, A.F.; Andrade, E.H.A.; Salimena, F.R.G.; Maia, J.G.S. Circadian and seasonal study of the cinnamate chemotype from *Lippia origanoides* Kunth. *Biochem. Syst. Ecol.* **2014**, *55*, 249-259.
11. Velasco J.; Rojas, J.; Salazar, P.; Rodríguez, M.; Díaz, T.; Morales, A.; Rondón, M. Antibacterial activity of the essential oil of *Lippia oreganoides* against multiresistant bacterial strains of nosocomial origin. *Nat. Prod. Commun.* **2007**, *2*, 85-88.
12. Tangarife-Castaño, V.; Correa-Royero, J.; Zapata-Londoño, B.; Durán, C.; Stashenko, E.E.; Mesa-Arango, A.C. Anti-*Candida albicans* activity, cytotoxicity and interaction with antifungal drugs of essential oils and extracts from aromatic and medicinal plants. *Infectio* **2011**, *15*, 160-167.
13. Betancur-Galvis, L.; Zapata, B.; Baena, A.; Bueno, J.; Ruíz-Nova, C.A.; Stashenko, E.E.; Mesa-Arango, A.C. Antifungal, cytotoxic and chemical analyses of essential oils of *Lippia origanoides* H.B.K grown in Colombia. *Salud UIS* **2011**, *43*, 141-148.
14. Pinto, C.P.; Rodrigues, V.D.; Pinto, F.P.; Pinto, R.P.; Uetanabaro, A.P.T.; Pinheiro, C.S.R.; Gadea, S.F.M.; Silva, T.R.S.; Lucchese, A.M. Antimicrobial activity of *Lippia* species from the Brazilian semiarid region traditionally used as antiseptic and anti-infective agents. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* **2013**, doi:10.1155/2013/6145015.

15. Nerio, L.S.; Olivero-Verbel, J.; Stashenko, E.E. Repellent activity of essential oils from seven aromatic plants grown in Colombia against *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera). *J. Stored Prod. Res.* **2009**, *45*, 212-214.
16. Caballero-Gallardo, K.; Olivero-Verbel, J.; Stashenko, E.E. Repellency and toxicity of essential oils from *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon flexuosus* and *Lippia origanoides* cultivated in Colombia against *Tribolium castaneum*. *J. Stored Prod. Res.* **2012**, *50*, 62-65.
17. Meneses, R.; Ocazonez, R.E.; Martínez, J.R.; Stashenko, E.E. Inhibitory effect of essential oils obtained from plants grown in Colombia on yellow fever virus replication *in vitro*. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **2009**, *8*, 6-8.
18. Escobar, P.; Leal, M.S.; Herrera, L.V.; Martinez, J.R.; Stashenko, E.E. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp essential oils and their major components. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2010**, *105*, 184-190.
19. Borges, A.R.; Aires, J.R.A.; Higino, T.M.M.; Medeiros, M.G.F.; Citó, A.M.G.L.; Lopes, J.A.D.; Figueiredo, R.C.B.Q. Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil. *Exp. Parasitol.* **2012**, *132*, 123-128.
20. Vicuña, G.C.; Stashenko, E.E.; Fuentes, J.L. Chemical composition of the *Lippia origanoides* essential oils and their antigenotoxicity against bleomycin-induced DNA damage. *Fitoterapia* **2010**, *81*, 342-349.
21. Teles, S.; Pereira, J.A.; de Oliveira, L.M.; Malheiro, R.; Lucchese, A.M.; Silva, F. *Lippia origanoides* H.B.K. essential oil production, composition, and antioxidant activity under organic and mineral fertilization: Effect of harvest moment. *Ind. Crops Prod.* **2014**, *60*, 217-225.
22. Castelo, A.V.M.; Del Menezzi, C.H.S.; Resck, I.S. Seasonal variation in the yield and the chemical composition of essential oils from two Brazilian native arbustive species. *J. Appl. Sci.* **2012**, *12*, 753-760.
23. NIST (National Institute of Standards and Technology). *Mass Spectral Library (NIST/EPA/NIH, v. 2.0d)*. The NIST Mass Spectrometry Data Center: Gaithersburg, MD, USA, 2005.
24. Adams, R.P. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, 4th ed.; Allured Publ. Corp.: Carol Stream, IL, USA, 2007.
25. Chorianopoulos, N.; Evergetis, E.; Mallouchos, A.; Kalpoutzakis, E.; Nychas, G.J.; Haroutounian, S.A. Characterization of the essential oil volatiles of *Satureja thymbra* and *Satureja parnassica*: Influence of harvesting time and antimicrobial activity. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 3139-3145.

26. Jerković, I.; Mastelić, J.; Miloš, M. The impact of both the season of collection and drying on the volatile constituents of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* grown wild in Croatia. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2001**, *36*, 649-654.
27. Sangwan, N.S.; Farooqi, A.H.A.; Shabih, F.; Sangwan, R.S. Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regul.* **2001**, *34*, 3-21.
28. Terblanché, F.C.; Kornelius, G. Essential oil constituents of the genus *Lippia* (Verbenaceae) - A literature review. *J. Essent. Oil Res.* **1996**, *8*, 471-485.
29. Matos, F.J.A.; Machado, M.I.L.; Craveiro, A.A.; Alencar, J.W. Essential oil composition of two chemotypes of *Lippia alba* grown in Northeast Brazil. *J. Essent. Oil Res.* **1996**, *8*, 695-698.
30. Zoghbi, M.G.B.; Andrade, E.H.A.; Santos, A.S.; Silva, M.H.L.; Maia, J.G.S. Essential oils of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. growing wild in the Brazilian Amazon. *Flavour Fragr. J.* **1998**, *13*, 47-48.
31. Zoghbi, M.G.B.; Andrade, E.H.A.; Silva, M.H.L.; Maia, J.G.S. Volatile constituents of *Lippia lupulina* Cham. *Flavour Fragr. J.* **2001**, *17*, 29-31.
32. Maia, J.G.S.; Taveira, F.S.N.; Andrade, E.H.A.; Silva, M.H.L.; Zoghbi, M.G.B. Essential oils of *Lippia grandis* Schau. *Flavour Fragr. J.* **2003**, *18*, 417-420.
33. Sarrazin, S.L.F.; Oliveira, R.B.; Barata, L.E.S.; Mourão, R.H.V. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Lippia grandis* Schauer (Verbenaceae) from the western Amazon. *Food Chem.* **2012**, *134*, 1474-1478.
34. Maia, J.G.S.; Silva, M.H.L.; Andrade, E.H.A.; Carreira, L.M.M. Essential oil variation in *Lippia glandulosa* Schauer. *J. Essent. Oil Res.* **2005**, *17*, 676-680.
35. Celiktaş, O.Y.; Kocabas, E.E.H.; Bedir, E.; Sukan, F.V.; Ozek, T.; Baser, K.H.C. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chem.* **2007**, *100*, 553-559.
36. Nostro, A.; Blanco, A.R.; Cannatelli, M.A.; Enea, V.; Flamini, G.; Morelli, I.; Roccaro, A.S.; Alonzo, V. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. *FEMS Microbiol. Lett.* **2004**, *230*, 191-195.
37. Ultee, A.; Bennik, M.H.J.; Moezelaar, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 1561-1568.
38. Ben Arja, A.; Combes, S.; Preziosi-Belloy, L.; Gontard, N.; Chalier, P. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Lett. Appl. Microbiol.* **2006**, *43*, 149-154.

39. Van den Dool, H.; Kratz, P.D.J.A. Generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J. Chromatogr. A* **1963**, *11*, 463-471.
40. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS/CLSI). *Reference method for broth dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*. Approved Standard, document M7-A6, 2004.

CAPÍTULO V

***Influência do processo de microencapsulação do óleo essencial de *Lippia origanoides* sobre a retenção de voláteis e potencial antimicrobiano frente a bactérias contaminantes de alimentos**

Sandra Layse F. Sarrazin¹, Ricardo B. Oliveira², Edemilson C. Conceição⁴, Juliana Divina A. Raposo³, José Guilherme S. Maia^{2,3}, Ana Paula F. Assunção², Rosa Helena V. Mourão^{1,2}.

Resumo

Lippia origanoides é utilizada na medicina popular do norte do Brasil no tratamento de distúrbios gastrointestinais, doenças respiratórias, ou como antisséptico de uso tópico. Carvacrol, reconhecido por seu potencial antimicrobiano, é o principal componente presente no óleo essencial (OE) desta espécie. O objetivo do presente estudo foi conhecer os efeitos do processo de microencapsulação do OE de *L. origanoides*, sobre retenção de voláteis e manutenção do potencial antimicrobiano. As microcápsulas foram obtidas pela técnica de secagem por *Spray drying*, utilizando goma arábica (GA) e maltodextrina (MA) como materiais de parede (3:3,6 m/m). O material em pó obtido foi caracterizado em termos de morfologia, eficiência de encapsulação, retenção de voláteis e potencial antimicrobiano. A análise morfológica foi determinada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). A composição química foi determinada por CG/EM e o potencial antimicrobiano avaliado pelo método de microdiluição em caldo. As microcápsulas apresentaram superfície denteada, porém sem fissuras aparentes, indicando proteção e retenção do núcleo. A eficiência de encapsulação foi determinada em 78%. A análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) mostrou que o processo de microencapsulação por *Spray drying* preservou 18% do total dos compostos previamente identificados no OE livre, permanecendo carvacrol como constituinte majoritário (57,78 %). O potencial antimicrobiano do OE microencapsulado foi verificado frente à *Bacillus cereus*, *B. subtilis* e *Salmonella typhimurium*, com valores de CIM de 0,4, 0,2 e 0,4 $\mu\text{L mL}^{-1}$, respectivamente, confirmando que o processo de secagem por *Spray drying* foi eficiente na retenção dos principais constituintes voláteis bioativos presentes no OE de *L. origanoides*.

Palavras-chave: óleo essencial, microencapsulação, *spray drying*, *Lippia origanoides*, potencial antimicrobiano.

Abstract

Lippia origanoides is used in folk medicine in Brazil north region for the treatment of gastrointestinal disorders, respiratory diseases, or as an antiseptic topical. Carvacrol, recognized for its antimicrobial potential, is the main component in the essential oil (EO) of this specie. The aim of this study was to understand the effects of the process of microencapsulation of *L. origanoides* EO on retention of volatile compounds and maintaining the antimicrobial potential. The microcapsules were obtained by spray drying technique, using arabic gum (AG) and maltodextrin (MA) as wall materials (3: 3.6 w/w). The powdered material obtained was characterized in terms of morphology, encapsulation efficiency, volatile and antimicrobial potential retention. Morphological analysis was determined by Scanning Electron Microscopy (SEM). The chemical composition was determined by GC/MS and antimicrobial potential measured by the microdilution broth method. The microcapsules showed irregular surface, but with no apparent cracks, indicating protection and core retention. The encapsulation efficiency was determined to 78%. Analysis by gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) showed that the microencapsulation by spray drying preserved 18% of total compounds previously identified in free essential oil, remaining carvacrol as a major constituent (57.78%). The microencapsulated EO antimicrobial potential was tested against *Bacillus cereus*, *B. subtilis* and *Salmonella typhimurium* and showed MIC values of 0.4, 0.2 and 0.4 $\mu\text{L mL}^{-1}$, respectively, confirming that the drying process was efficient in retaining the main volatile constituents in *L. origanoides* OE.

Keywords: essential oil, microencapsulation, spray drying, *Lippia origanoides*, antimicrobial potential.

* Parte da Tese de Doutorado da primeira autora, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da rede BIONORTE. ¹ Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal, Universidade Federal do Amazonas, 60077-000 Manaus - AM, Brasil. ² Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia, Laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental, Universidade Federal do Oeste do Pará, 68135-110 Santarém - PA, Brasil. ³ Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Federal do Pará, 66075-110 Belém - PA, Brasil. ⁴ Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica, Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, 74605-220 - Goiânia- GO, Brasil.

1. Introdução

Lippia origanoides Kunth é uma espécie aromática de porte arbustivo, frequentemente utilizada na medicina popular no tratamento de distúrbios gastrointestinais, doenças respiratórias, inflamações uterinas, corrimento vaginal, distúrbios menstruais ou como um antisséptico para feridas, boca e irritação da garganta (Oliveira et al., 2014). Diferentes estudos tem demonstrado o potencial bioativo do OE desta espécie, dando respaldo a seu uso popular. Entre estes, destacam-se o potencial repelente (Caballero-Gallardo et al., 2012), antiprotozoário (Borges et al., 2012), antiviral (Menezes et al., 2009), antígeno tóxico (Vicuña et al., 2010) antioxidante (Acevedo et al., 2007) e potencial antimicrobiano contra diferentes microorganismos de importância clínica (Oliveira et al., 2007; Betancur-Galvis et al., 2011; Sarrazin et al., 2015).

O interesse em OE para preservar a qualidade de alimentos tem aumentado significativamente nos últimos anos, e diferentes estudos sobre o potencial antimicrobiano de um amplo número de OE tem sido reportado (Burt, 2004). Porém, de maneira geral, OE são compostos por substâncias voláteis, e grande parte de seus constituintes bioativos podem sofrer degradação quando expostos a altas temperaturas, oxidação e/ou radiações UV (López et al., 2014). Em adição, reações entre os componentes presentes em OE e lipídios, carboidratos, ou outros aditivos, bem como as condições de estocagem, podem acarretar na diminuição da atividade de compostos antimicrobianos (Del Toro-Sánchez et al., 2010). Assim, a extensão desses efeitos pode ser suficiente para alterar a qualidade dos produtos finais, limitando seu uso em aplicações comerciais.

A fim de melhorar a solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade de OE, alguns métodos foram introduzidos. A tecnologia de microencapsulação é um dos processos mais eficientes para minimizar danos a estes compostos, aumentando a estabilidade química e consequente eficiência biológica, além de facilitar o transporte e manuseio devido ao processo de solidificação (Liolios et al., 2009; Teodoro et al., 2014, Xiao et al., 2014).

Entre as diferentes técnicas de microencapsulação de OE, *spray drying* destaca-se por ser um processo bem estabelecido em muitos setores da indústria de alimentos (Fernandes et al., 2013b). Uma vez encapsulado, o núcleo é protegido de fatores ambientais externos, bem como de outros componentes presentes na matriz alimentar, tornando o processo de encapsulação capaz de melhorar o valor nutricional, sem afetar o sabor, o aroma ou a textura dos alimentos, e ainda aumentar a vida de prateleira e a estabilidade do ingrediente ativo presente no produto final (Augustin e Hemar, 2009).

A atividade de microorganismos e reações de oxidação são consideradas como a

maior causa de deterioração de alimentos, e apesar das diferentes técnicas de preservação disponíveis, a indústria alimentícia ainda não dispõe de um adequado controle sobre o processo de deterioração (Ojeda-Sana et al., 2013).

O objetivo do presente estudo foi conhecer os efeitos do processo de microencapsulação do OE de *L. origanoides*, sobre retenção de voláteis e manutenção do potencial antimicrobiano frente a *B. cereus*, *B. subtilis* e *S. enterica*, espécies frequentemente associadas a doenças de origem alimentar. As microcápsulas foram obtidas pela técnica de secagem por pulverização (*Spray drying*) e o OE microencapsulado foi caracterizado em termos de eficiência de encapsulação, composição química e potencial antimicrobiano, sendo este o primeiro estudo com aplicação tecnológica para desenvolvimento de um bioproduto derivado do óleo essencial de *Lippia origanoides*.

2. Material e métodos

2.1. Reagentes utilizados

Diclorometano e n-hexano, foram adquiridos da Merck (Rio de Janeiro, Brasil). Os meios de cultura de microorganismos foram adquiridos da Himedia (Mumbai, Índia). Drogas e reagentes (Tween 80 e resazurina, sulfato de sódio anidro) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Goma arábica e maltodextrina foram adquiridas da Vetec (Brasil) e Sigma-Aldrich, respectivamente.

2.2. Material vegetal e extração do EO

Folhas e ramos finos de *Lippia origanoides* foram coletados (Maio de 2015) em um plantio experimental da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), localizado às margens da Rodovia Everaldo Martins (PA-457), km 26, município de Santarém, Estado do Pará, Brasil. A posição geográfica do local de coleta foi determinada por GPS, resultando nas seguintes coordenadas: 02 ° 30'870 " S e 54 ° 56'416 " W, e altitude de 52 m acima do nível do mar. Exemplares testemunhos foram depositados no herbário da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil, sob o número CESJ-64029. O OE, obtido hidrodestilação (proporção de 1:10 (p/v) por 3h), foi seco em sulfato de sódio anidro e seu teor percentual foi calculado com base no peso seco da planta.

2.3. Microencapsulação de óleo essencial por *Spray drying*

Goma arábica (GA) e maltodextrina (MD - dextrose equivalente 4-7) foram utilizadas como materiais de parede (3:3,6 m/m – 6,6%). A concentração do OE adicionado foi de 1% com base no volume total da emulsão. Para assegurar a saturação completa das moléculas do polímero, o material de parede foi previamente dissolvido em água deionizada e mantido por um período de 12h à temperatura ambiente. Subsequentemente, o OE foi lentamente adicionado à dispersão, sob agitação de 10.000 rpm durante 10 min., utilizando um sistema de homogeneização digital de alta velocidade (Ultra Turrax - T25, Wilmington, NC, EUA).

O processo de secagem foi realizado em *Spray drier* (modelo MSD 1,0 - LABMAQ Ribeirão Preto-SP, Brasil), equipado com câmara cilíndrica de 50 cm de altura por 9 cm de diâmetro, bico atomizador do tipo duplo fluido, com abertura de 0,7 milímetros de diâmetro. A alimentação foi realizada através de uma bomba peristáltica, com fluxo aspersor de 45 L min⁻¹; temperatura do ar de entrada de 160°C e saída de 124°C; vazão do ar de secagem a uma velocidade de 4 mL min⁻¹ e volume do fluxo do ar de 4 m³ min⁻¹. A pressão de ar comprimido para o fluxo de atomização foi fixada em 60 psi. Durante o processo de secagem, a emulsão de alimentação foi continuamente homogeneizada, utilizando um sistema de agitação com barra magnética. O produto resultante foi armazenado em recipiente de vidro âmbar, ao abrigo da luz, e temperatura de 4 °C.

2.3.1. *Rendimento percentual de microcápsulas*

O rendimento percentual das microcápsulas foi determinado pela razão entre massa total de microcápsulas obtidas e a massa de sólidos totais (polímeros + OE) utilizada no preparo da emulsão, de acordo com a fórmula descrita por Banerjee e colaboradores (2013):

$$\text{Rendimento \%} = \left[\frac{\text{Quantidade de microcápsulas obtidas (g)}}{\text{Total (óleo essencial + polímeros) adicionados à emulsão}} \right] \times 100$$

2.3.2. *Eficiência de encapsulação (EE)*

A EE do OE de *L. origanoides* foi calculada de acordo com a fórmula descrita por Delfiya e colaboradores (2014).

$$EE (\%) = \frac{OE_r - OE_s}{OE_r} \times 100$$

onde, OE_r representa a quantidade total de óleo essencial retido e OE_s representa o teor de óleo superficial.

2.3.2.1. Teor de óleo retido

O teor de óleo retido é dado pela quantidade de óleo que se encontra na partícula, após o processo de encapsulação, em relação à sua quantidade inicial. A determinação do óleo retido foi calculada como reportado por Risch e Reineccius (1988). Resumidamente, 10 mg de microcápsulas foram dissolvidos em 0,5 mL de água destilada e homogeneizados por 1 min., seguida da extração do OE por adição de 10 mL de acetona. Após mistura sob agitação em vortex, as amostras foram centrifugadas à 3.000 rpm durante 10 min. A concentração de OE ($\mu\text{g mL}^{-1}$) extraída na fase líquida, foi determinada espectrofotometricamente, pelo método de normalização externa, utilizando curva padrão previamente elaborada.

2.3.2.2. Teor de óleo superficial

O teor de óleo superficial (quantidade de óleo localizado na parte externa da partícula - $\mu\text{g mL}^{-1}$) foi calculado de acordo com metodologia descrita por Delfiya e colaboradores (2014), com modificações. Cinco mililitros de etanol foram adicionados a 1 g de microcápsulas, agitados manualmente por 30 seg, com posterior centrifugação a 3.000 rpm por 10 min. Após separação de fases, o sobrenadante foi filtrado em filtro tipo Nylon (poro de 0,22 μm , Allcron) e o OE superficial foi quantificado usando curva padrão previamente elaborada.

2.3.2.3. Elaboração da curva padrão

Soluções contendo diferentes concentrações do OE (0,2 a 3,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foram preparadas. Os valores de absorvância foram determinados em espectrofotômetro (UV-Vis – Quimis) a 400 nm. A curva de calibração foi obtida por plotagem das concentrações padrões de OE (x) e valores de absorvância (y), obtendo-se a seguinte equação:

$$y = 0,0514x - 0,0164$$

onde y e x representam os valores de absorvância e concentração de OE, respectivamente. ($R^2 = 0,9755$).

2.4. Análise morfológica

Para análise morfológica, as microcápsulas foram inicialmente fixadas em porta-espécimes metálicos (stubs), sobre fita adesiva dupla face condutora convencional. Em seguida foram revestidas com liga de ouro (pulverização catódica em mesa de vácuo Dentom V) e analisadas com auxílio de microscopia eletrônica de varredura (MEV), em equipamento JEOL JSM modelo – 6610, equipado com EDS Thermo NSS científica Spectral Imaging, operado com tensão de 5 kV. As imagens foram capturadas após aumento de 3.500x. As análises foram realizadas no Laboratório Multi-usuário de Microscopia de Alta Resolução (LabMic) do Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás (IF-UFG).

2.5. Análise da composição química do OE livre e dos voláteis microencapsulados

A análise química foi realizada em um sistema CG/EM-QP2010 Ultra (Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan), com injetor automático AOC-20i e software CG/EM solution, que inclui um banco de dados das bibliotecas Willey, NIST e FFNSC. Uma coluna capilar de sílica fundida Rxi-5ms (Restek Corporation, Bellefonte, PA) de 30m x 0,25 mm (diâmetro) x 0,25 μm (espessura da película), revestida com 5% de difenil dimetilpolisiloxano foi utilizada. As condições de análise foram: temperatura do injetor de 250°C; programação de temperatura do forno de 60-240°C (3°C min⁻¹). Hélio (99.995%) foi utilizado como gás de arraste, ajustado a uma velocidade linear de 36,5 cm/sec (taxa de 1,0 mL min⁻¹); injeção no modo split (1 μL); razão split 1:20; ionização por impacto eletrônico (EI) de 70 eV; temperatura da fonte de ionização e da linha de transferência de 200 e 250°C, respectivamente. Os espectros de massa foram obtidos por varredura automática, à 0,3 segundos, com fragmentos de massas na faixa de 35-400 m/z. O índice de retenção foi calculado para todos os componentes voláteis, utilizando um série homóloga de n-alcanos C8-C20 (Sigma-Aldrich), de acordo com a equação linear de Van den Dool e Kratz (1963). Os compostos foram identificados por comparação entre seus espectros de massas (massa molecular e o padrão de fragmentação) com os espectros existentes na biblioteca do sistema CG/EM solution e na literatura (Adams, 2007), e por comparação de seus índices de retenção.

2.6. Atividade antimicrobiana do OE de *Lippia organoides* microencapsulado contra bactérias contaminantes de alimentos

2.6.1. Microorganismos e condições de cultivo

As cepas utilizadas nos ensaios antimicrobianos foram adquiridas comercialmente na forma liofilizada: *Bacillus subtilis* CCCD (B005), *Bacillus cereus* (CCCD B001) e *Salmonella typhimurium* (CCCD S004). Os microorganismos foram hidratados em caldo nutriente (CN) a 37 ± 2 °C, durante 24 h. Os inóculos foram preparados através da inoculação direta de colônias em 1 mL de solução salina estéril, ajustada ao padrão 0,5 na escala de McFarland, correspondente a $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹.

2.6.2. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Os valores de CIM conferidos ao EO de *L. organoides* microencapsulado foram determinados pelo método padrão de microdiluição em caldo (NCCLS/CLSI, 2004), com modificações. Para isso, 40 mg de microcápsulas foram diluídas em 1 mL de água destilada estéril. Para liberação do óleo microencapsulado, a mistura foi submetida à agitação em vortex por aprox. 2 min., com posterior centrifugação a 3.000 rpm durante 10 min. A partir desta solução, concentrações variando entre 0,007 e 20,0 µL mL⁻¹, foram igualmente preparadas. Os inóculos foram inicialmente ajustados de acordo com o padrão 0,5 da escala de MacFarland e posteriormente diluídos (fator de diluição de 1:10, solução salina estéril) para obtenção da concentração final de $1,5 \times 10^4$ UFC mL⁻¹. Os testes foram realizados em placas de 96 poços, onde cada poço recebeu 90 µL da concentração específica de soluções contendo óleo microencapsulado, 90 µL de solução estéril de MHB e 20 µL do inóculo. Ampicilina foi utilizada como controle positivo. O controle de ação dos materiais de parede e controle de esterilidade do meio foram realizados simultaneamente. Cada poço comportou volume final de 200 µL.

A inibição do crescimento de bactérias foi revelada pela adição de solução estéril de resazurina (20 µL, 0,02%, p/v), seguida de re-incubação durante 3 h, sob as mesmas condições descritas acima. A CIM foi definida como a menor concentração do OE microencapsulado capaz de inibir o crescimento de microorganismos. Os testes foram realizados em triplicata.

3. Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as diferenças entre as médias foram determinadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), utilizando GraphPad Prism 5.0 e Microsoft Excel como programas estatísticos.

4. Resultados e discussão

4.1. Rendimento percentual e eficiência de encapsulação

Neste estudo, a mistura GA/MD (3:3,6 m/m) foi utilizada como material de parede. O processo de secagem foi realizado em *spray drier*, com temperatura do ar de entrada à 160°C e saída de 124°C. Nestas condições, o rendimento percentual de microencápsulas foi de 30,26 %. Estudos conduzidos por Chatterjee e Bhattacharjee (2013), realizados sob condições operacionais semelhantes, reportaram rendimento máximo (62%) no processo de microencapsulação do OE de *Syzygium aromaticum*, quando utilizada a mistura GA/MD na proporção de 2,4:4,8 (m/m). Com esta proporção de material de parede, os autores obtiveram valores de eficiência próximos a 65%.

Utilizando amido modificado (AM) e MD (1:1 m/m), Teodoro e colaboradores (2014) obtiveram rendimento de 39,5% no processo de microencapsulação do OE de *Rosmarinus officinalis* L. Fernandes e colaboradores, (2013b), utilizando diferentes proporções de GA no processo de encapsulação (10 a 30%) do OE desta mesma espécie, obteve rendimento de 24,4%.

A eficiência de encapsulação para o OE de *L. origanoides* foi determinada em 78%. Delfija e colaboradores, (2010) verificaram que quanto maior a concentração de GA na emulsão, maior é a *EE*. Fernandes e colaboradores (2008), por exemplo, observaram que o aumento na *EE* do OE de *L. sidoides*, foi proporcional ao aumento da concentração da GA na mistura GA/MD.

4.2. Caracterização morfológica

A morfologia das microcápsulas foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura. Esta técnica permitiu visualizar a estrutura externa das microcápsulas e avaliar sua integridade, observando a presença de porosidades ou fissuras. O efeito do processo de secagem por *Spray drying* sobre a morfologia externa das microcápsulas pode ser observado na Figura 01.

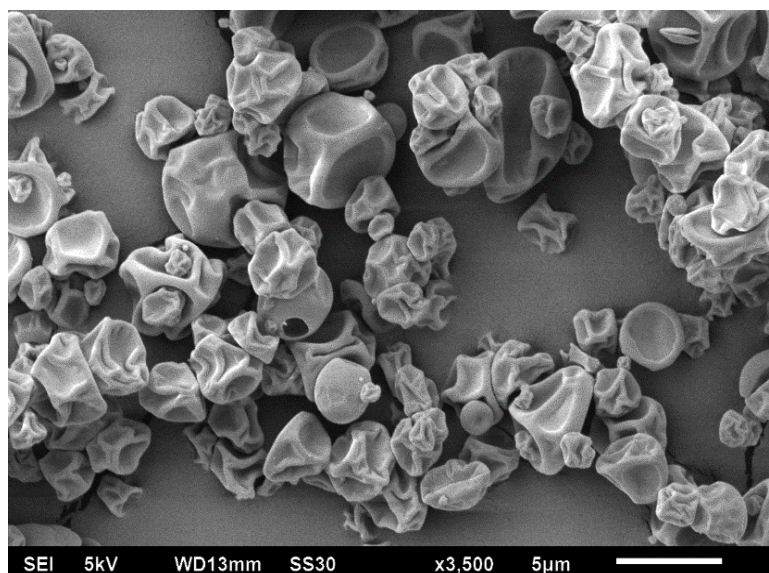


Figura 01 - Microcápsulas contendo óleo essencial de *Lippia origanoides*, obtidas por secagem em *Spray drier*, com bico aspersor de 0,7 mm, temperatura do ar de entrada de 160 °C, e saída de 124°C. Alimentação por bomba peristáltica com fluxo aspersor de 45 L min⁻¹; vazão do ar de secagem à 4 mL min⁻¹; volume do fluxo do ar de 4 m³ min⁻¹ e pressão de 60 psi. Sei: 5 kV, SS30, ampliação de 3.500x e escala de 5 µm.

O produto final obtido apresentou partículas esféricas, com tamanhos variados e superfície externa denteada, porém sem rachaduras ou fissuras aparentes, indicando retenção do núcleo. Características morfológicas semelhantes foram também observadas em microcápsulas contendo OE de *L. sidoides* (Fernandes et al., 2008), OE de orégano (Botrel et al., 2012) e óleos resina de cardamom (Krishnan et al., 2005).

De acordo com Annamalai e colaboradores (2014), microcápsulas produzidas por *Spray drying* revelam uma variação típica de tamanho, indicando que, durante este processo, diferentes tamanhos de gotas são formados. Superfícies denteadas são resultantes do lento processo de formação de filme durante a secagem das gotas atomizadas levando ao encolhimento das gotículas durante as fases iniciais da secagem Ré (1998).

4.3. Análise de retenção de voláteis

Uma vez sabendo que o potencial biológico de OE pode mudar em função de sua composição, a manutenção dos constituintes bioativos de OE após o processo de microncapsulação torna-se tão importante quanto a eficiência de encapsulação. No presente trabalho, os percentuais relativos dos principais constituintes presentes no OE de *L. origanoides* antes e depois do processo de microencapsulação foram determinados por CG-EM. Os resultados são representados na Tabela 01.

Tabela 01 - Composição química do óleo essencial de *Lippia origanoides* antes e depois do processo de microencapsulação por *Spray drying*.

IR _{Calc.}	IR _{Lit.}	Constituintes	Óleo essencial livre	Óleo essencial microencapsulado
			%	%
850	850	(Z)-Hex-3-en-1-ol	0,11	-
927	924	α -Tujeno	0,85	-
934	932	α -Pino	0,48	-
976	974	1-Octen-3-ol	0,23	-
978	974	β -Pino	0,18	-
991	988	Mirceno	1,4	0,5
1017	1014	α -Terpineno	0,88	-
1025	1020	<i>p</i> -Cimeno	10,13	7,04
1029	1024	Limoneno	0,23	-
1032	1026	1,8-Cineol	0,95	-
1059	1054	γ -Terpineno	2,69	-
1068	1065	<i>cis</i> -Sabineno	0,12	-
1100	1095	Linalol	5,01	2,9
1146	1140	Ipsdienol	0,34	-
1167	1169	Borneol	0,12	-
1175	1167	Umbellulona	0,32	-
1179	1174	Terpinen-4-ol	0,97	-
1186	1179	<i>p</i> -Cimeno-8-ol	0,06	-
1192	1186	α -Terpinol	0,15	-
1235	1232	Timol metil éter	0,55	0,55
1273	1264	Geranial	0,06	-
1286	-	isômero do timol	0,37	-
1293	1289	Timol	9,97	8,02
1296	-	Carvacrol metil éter	0,38	-
1305	1298	Carvacrol	36,7	57,78
1355	1349	Timol acetato	0,65	-
1373	1370	Carvacrol acetato	1,54	-
1384	1379	Geranil acetato	0,38	-
1424	1417	(<i>E</i>)-Cariofileno	3,64	3,65
1438	1432	α -trans-Bergamoteno	0,26	-
1458	1452	α -Humuleno	0,47	-
1480	1478	γ -Muurolena	0,1	-
1485	1484	<i>p</i> -metoxitimol	0,44	-
1490	1489	β -Selineno	0,2	-
1495	1491	<i>p</i> -metoxicarvacrol	9,83	15,67
1505	1506	(Z)- α -Bisaboleno	0,21	-
1511	1505	β -Bisaboleno	0,37	-
1518	1513	γ -Cadineno	0,09	-
1527	1522	δ -Cadineno	0,28	-
1573	-	<i>p</i> -metoxicarvacrol acetato (tentativa)		-

1545	1540	(E)- α -Bisaboleno	0,67	-
1587	1582	Óxido de cariofileno	2,89	1,87
1614	1608	Humuleno epoxido II	0,17	-
1619	1619	1,10-di-epi-Cubenol	0,04	-
1645	1644	α -Muurolol	0,06	-
1658	1652	α -cadinol	0,24	-
1686	1685	α -Bisabolol	0,11	-
Total de compostos identificados			95,89	97,98

IR_{Calc} = Índice de Retenção calculado em coluna capilar de sílica fundida Rxi-5ms ; IR_{Lit} = Índice de Retenção da literatura (Adams, 2007).

Entre os componentes identificados, carvacrol destaca-se como constituinte majoritário em ambas as amostras. Sua concentração relativa aumentou de 36,7 para 57,78% após o processo de encapsulação. Da mesma forma, a concentração de *p*-metoxicarvacrol aumentou de 9,83 para 15,67%. Por outro lado, verificou-se uma pequena redução na concentração de timol (de 9,97% para 8,02%), *p*-cimeno (de 10,13 para 7,4%) e linalol (de 5,01 para 2,9%), quando comparados aos percentuais representados no óleo livre.

Jafari e colaboradores (2008) reportam que a retenção de volatéis durante o processo de encapsulação é afetada tanto pelas propriedades do material de parede, quanto pelas propriedades do material que compõe o núcleo (peso molecular, volatilidade relativa, polaridade e solubilidade). Segundo os autores, moléculas de baixo peso molecular, alta volatilidade e solúveis em água são perdidas a um grau maior do que moléculas maiores, menos voláteis e menos solúveis. Ainda segundo os autores, outro fator que deve ser levado em consideração são as interações físicas ou físico-químicas, entre os componentes do núcleo e do material de parede.

4.4. Atividade antimicrobiana de microcápsulas contendo OE de *L. origanoides*

O potencial antimicrobiano do OE de *L. origanoides* foi previamente reportado (Oliveira et al., 2007; Betancur-Galvis et al., 2011). No presente estudo, o processo de microencapsulação por *Spray drying*, além de apresentar eficácia na retenção dos principais constituintes voláteis do OE desta espécie, também apresentou eficácia na manutenção de seu potencial antimicrobiano. Os resultados são representados na Tabela 02.

Tabela 02 - Comparação entre a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *L. origanoides* livre e microencapsulado contra microorganismos contaminantes de alimentos.

Microorganismos	Óleo essencial livre	Óleo essencial microencapsulado	Ampicilina
	CIM $\mu\text{L mL}^{-1}$	CIM $\mu\text{L mL}^{-1}$	CIM $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>Bacillus cereus</i> CCCD B001	0,62	0,4	1,5
<i>Bacillus subtilis</i> CCCD B005	1,25	0,2	0,18
<i>Salmonella typhimurium</i> CCCD S004	1,25	0,4	1,5

CIM- concentração inibitória mínima

Ambas as amostras apresentaram resultados semelhantes frente à *B. subtilis* e *S. typhimurium*, com redução dos valores de CIM de 1,25 para 0,4 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Da mesma forma, o valor de CIM frente a *B. subtilis* foi reduzido de 1,25 para 0,2 $\mu\text{L mL}^{-1}$ após microencapsulação. A redução dos valores de CIM provavelmente está associada a variações nas proporções relativas dos componentes fenólicos, provenientes do processo de microencapsulação.

Resultados semelhantes foram obtidos por Leimann e colaboradores (2009), onde o óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, microencapsulado por coacervação simples, apresentou valores de CIM idênticos aos valores obtidos pelo OE livre.

Segundo Arana-Sanchez e colaboradores (2009), o bom desempenho apresentado por OE microencapsulados pode ser explicado pelo aumento relativo dos compostos com potencial antimicrobiano, associado à diminuição dos compostos não antimicrobianos. Ainda segundo os autores, quanto maior a concentração de carvacrol e timol na composição de OE, mais eficaz é a inibição do crescimento de microrganismos. No presente estudo, o conteúdo percentual de carvacrol presente nas microcápsulas apresentou aumento relativo de aprox. 20% comparado ao óleo livre, indicando que o processo de microencapsulação foi eficaz na retenção do principal constituinte ativo presente no OE de *L. origanoides*.

Em estudos conduzidos por Hernandez-Hernández e colaboradores (2014), o processo de microencapsulação por *Spray drying* favoreceu a efetividade de carvacrol e timol na inibição de crescimento de microorganismos. Da mesma forma, Liolios e colaboradores (2009) comprovaram a eficácia antimicrobiana de microcápsulas lipossomais contendo carvacrol e timol isolados do óleo *Origanum dictamnus*, demonstrando que o efeito inibitório dos compostos foi aumentado após o processo de encapsulação. O sinergismo entre carvacrol, timol e outros componentes presentes em OE também tem sido reportado (Bakkali et al., 2008).

Conclusões

A retenção dos principais constituintes voláteis e a manutenção do potencial antimicrobiano do OE de *L. origanoides* após microencapsulação por *Spray drying*, evidenciam a viabilidade técnica do processo. Por outro lado, sabendo que as propriedades das microcápsulas (tamanho e morfologia da superfície, rendimento percentual, eficiência de encapsulação, comportamentos de libertação e potencial bioativo) dependem diretamente das variáveis do processo, futuros estudos devem ser conduzidos, visando sua otimização.

Referências

1. Acevedo, A.M.; Castañeda, M.L.; Blanco, K.M.; Cardenas, C.Y.; Reyes, J.A.; Kouznetsov, V.V.; Stashenko, E.E. Composición y capacidad antioxidante de especies aromáticas y medicinales con alto contenido de timol y carvacrol. *Scientia et Technica*, 33: 125-128, 2007.
2. Adams, R.P. Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4th ed.; Allured Publ. Corp.: Carol Stream, IL, USA, 2007.
3. Annamalai, J.; Dushyant, K.; Gudipati, V. Oxidative stability of microencapsulated fish oil during refrigerated storage. *Journal of Food Processing and Preservation*, p. 1-12, 2015.
4. Arana-Sánchez, A.; Estarrón-Espinosa, M.; Obledo-Vázquez, E.N.; Padilla-Camberos, E.; Silva-Vázquez, R.; Lugo-Cervantes, E. Antimicrobial and antioxidant activities of Mexican oregano essential oils (*Lippia graveolens* H.B.K.) with different composition when microencapsulated in β -cyclodextrin. *Letters in Applied Microbiology*, 50: 585-590, 2010.
5. Augustin, M.A. and Hemar, Y. Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. *Chemical Society Reviews*, 38: 902-912, 2009.
6. Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M. Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 446-475, 2008.
7. Banerjee, S.; Chattopadhyay, P.; Ghosh, A.; Goyary, D.; Karmakar, S.; Veer, V. Influence of process variables on essential oil microcapsule properties by carbohydrate polymer-protein blends. *Carbohydrate polymers*, 93: 691-697, 2013.
8. Betancur-Galvis, L.; Zapata, B.; Baena, A.; Bueno, J.; Ruíz-Nova, C.A.; Stashenko, E, Mesa-Arango, A.C. Antifungal, cytotoxic and chemical analyses of essential oils of *Lippia origanoides* H.B.K grown in Colombia. *Salud Uis*, 43: 141-148, 2011.

9. Borges, A.R.; Aires, J.R.A.; Higino, T.M.M.; Medeiros, M.G.F.; Citó, A.M.G.L.; Lopes, J.A.D.; Figueiredo, R.C.B.Q. Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil. *Experimental Parasitology*, 132: 123-128, 2012.
10. Botrel, D.A.; Borges, S.V.; Fernandes, R.V.B.; Viana, A.D.; Costa, J.M.G.; Marques, G.R. Evaluation of spray drying conditions on properties of microencapsulated oregano essential oil. *International Journal of Food Science and Technology*, 47, 2289-2296, 2012.
11. Burt, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223-253, 2004.
12. Caballero-Gallardo, K.; Olivero-Verbel, J.; Stashenko, E.E. Repellency and toxicity of essential oils from *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon flexuosus* and *Lippia origanoides* cultivated in Colombia against *Tribolium castaneum*. *Journal of Stored Products Research*, 50: 62-65, 2012.
13. Chatterjee, D.; Bhattacharjee, P. Comparative evaluation of the antioxidant efficacy of encapsulated and un-encapsulated eugenol-rich clove extracts in soybean oil: Shelf-life and frying stability of soybean oil. *Journal of Food Process Engineering*, 117: 545-550, 2013.
14. Cosentino, S.; Tuberoso, C.I.G.; Pisano, B.; Satta, M.; Mascia, V.; Arzedi, E.; Palmas, F. In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology*, 29: 130-135, 1999.
15. Del Toro-Sánchez, C.L.; Ayala-Zavala, J.F.; Machi, L.; Santacruz, H.; Villegas-Ochoa, M.A.; Alvarez-Parrilla, E.; González-Aguilar, G.A. Controlled release of antifungal volatiles of thyme essential oil from β -cyclodextrin capsules. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 67: 431-441, 2010.
16. Delfiya, D.S.A.; Thangavel, K.; Natarajan, N.; Kasthuri, R.; Kailappan, R. Microencapsulation of turmeric oleoresin by spray drying and in vitro release studies of microcapsules. *Journal of Food Process Engineering*, 38: 37-48, 2015.
17. Fernandes, L.P.; Oliveira, W.P.; Sztatisz, J.; Cs Novák. Thermal properties and release of *Lippia sidoides* essential oil from gum arabic/maltodextrin microparticles. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 94: 461-467, 2008. Fernandes, R.V.B.; Borges, S.V.; Botrel, D.A.; Silva, E. K.; Costa, J.M.G.; Queiroz, F. Microencapsulation of rosemary essential oil: Characterization of particles. *Drying Technology*, 31: 1245-1254, 2013a.
18. Fernandes, R.V.B.; Borges, S.V.; Botrel, D.A. Influence of spray drying operating

- conditions on microencapsulated rosemary essential oil properties. *Ciência e tecnologia de alimentos*, 33: 171-178, 2013b.
19. Guarda, A.; Rubilar, J. F.; Miltz, J.; Galotto, M.J. The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. *International Journal of Food Microbiology*, 146: 144-150, 2011.
 20. Hernández-Hernández, E.; Regalado-González, C.; Vázquez-Landaverde, P.; Guerrero-Legarreta, I.; García-Almendárez, B.E. Microencapsulation, chemical characterization, and antimicrobial activity of Mexican (*Lippia graveolens* H.B.K.) and european (*Origanum vulgare* L.) oregano essential oils. *The Scientific World Journal*, 2014: 1-12, 2014.
 21. Jafari, S.M.; Assadpoor, E.; He, Y. Bhandari, B. Encapsulation efficiency of food flavours and oils during spray drying. *Drying Technology*, 26: 816-835, 2008.
 22. Krishnan, S.; Bhosale, R.; Singhal, R.S. Microencapsulation of cardamom oleoresin: Evaluation of blends of gum arabic, maltodextrin and a modified starch as wall materials. *Carbohydrate Polymers*, 61: 95-102, 2005.
 23. Leimann, F.V.; Gonçalves, O.H.; Machado, R.A.F. Antimicrobial activity of microencapsulated lemongrass essential oil and the effect of experimental parameters on microcapsules size and morphology. *Materials Science and Engineering C*, 29: 430-436, 2009.
 24. Liolios, C.C.; Gortzi, O.; Lalas, S.; Tsaknis, J.; Chinou, I. Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and *in vitro* antimicrobial activity. *Food Chemistry*, 112: 77-83, 2009.
 25. López, A.; Castro, S.; Andina, M.J.; Ures, X.; Munguía, B.; Llabot, J.M. Elder, H.; Dellacassa, E.; Palma, S.; L. Domínguez, L. Insecticidal activity of microencapsulated *Schinus molle* essential oil. *Industrial Crops and Products*, 53: 209-216, 2014.
 26. Menezes, R.; Torres, F.A.; Stashenko, E.; Ocazonez, R.E.; Aceites esenciales de plantas colombianas inactivan el virus del dengue y el virus de la fiebre amarilla. *Salud UIS* 41: 236-243, 2009.
 27. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS/CLSI). *Reference method for broth dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*. Approved Standard, document M7-A6, 2004.
 28. Ojeda-Sana, A.M., Baren, C.M.V., Elechosa, M.A., Juárez, M.A., Moreno, S. New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components. *Food Control*, 31: 189-195, 2013.

29. Oliveira, D.R.; Leitão, G.G.; Bizzo, H.R.; Lopes, D.; Alviano, D.S.; Alviano, C.S.; Leitão, S.G. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K. Food Chemistry, 101: 236-240, 2007.
30. Oliveira, D.R.; Leitão, G.G.; Fernandes, P.D.; Leitão, S.G. Ethnopharmacological studies of *Lippia origanoides*. Revista Brasileira de Farmacognosia, 24: 206-214, 2014.
31. Ré, M.I. Microencapsulation by *Spray drying*. Drying Technology, 16: 1195-1236, 1998.
32. Risch SJ, Reineccius GA. 1988. Spray-dried orange oil-Effect of emulsion size on flavor retention and shelf life. In: Risch SJ, Reineccius GA, editors. Flavor encapsulation. Washington DC: Amer Chem Soc. p 67-77
33. Sarrazin, S.L.F.; Silva, L.A.; Assunção, A.P.F.; Oliveira, R.B.; Calao, V.Y.P.; Silva, R. Stashenko, E.E.; Maia, J.G.S.; Mourão, R.H.V. Antimicrobial and seasonal evaluation of the carvacrol-chemotype oil from *Lippia origanoides* Kunth. Molecules, 20: 1860-1871, 2015.
34. Teodoro, R.A.R.; Fernandes, R.V.B.; Botrel, D.A.; Borges, S.V.; Souza, A.U. Characterization of microencapsulated rosemary essential oil and its antimicrobial effect on fresh dough. Food and Bioprocess Technology, 7: 2560-2569, 2014.
35. Van den Dool, H.; Kratz, P.D.J.A. Generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. Journal of Chromatography A, 11, 463-471, 1963.
36. Vicuña, G.C.; Stashenko, E.E.; Fuentes, J.L. Chemical composition of the *Lippia origanoides* essential oils and their antigenotoxicity against bleomycin-induced DNA damage. Fitoterapia, 81: 343-349, 2010.
37. Xiao, Z.; Liu, W.; Zhu, G.; Zhor, R.; Niu, Y. A review of the preparation and application of flavour and essential oils microcapsules based on complex coacervation technology. Journal of the Science Food and Agriculture, 94: 1482-1494, 2014.

Anexos

RESEARCH

Open Access



Antibacterial action against food-borne microorganisms and antioxidant activity of carvacrol-rich oil from *Lippia origanoides* Kunth

Sandra Layse F. Sarrazin¹, Leomara A. da Silva², Ricardo B. Oliveira², Juliana Divina A. Raposo³, Joyce Kelly R. da Silva³, Fátima Regina G. Salimena⁴, José Guilherme S. Maia^{2,3*} and Rosa Helena V. Mourão^{1,2}

Abstract

Background: *Lippia origanoides* Kunth from Northeast Brazil is a plant of pleasant odor used by local people as a food seasoning in substitution the oregano where its carvacrol-rich oil has showed significant antimicrobial activity against human pathogens.

Methods: GC and GC-MS analyzed the plant oil composition and its antibacterial activity was evaluated by disk diffusion and microdilution broth methods. The determination of oil antioxidant activity was made by DPPH radical scavenging assay. Oil toxicity was performed on mice.

Results: The main constituents of the oil were carvacrol (47.2 %), thymol (12.8 %), *p*-cymene (9.7 %), and *p*-methoxythymol (7.4 %). The oil was active against the bacteria of *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, and *Salmonella typhimurium*, except for *Pseudomonas aeruginosa*. The antioxidant activity has displayed a high dose–response ($r^2 = 0.92$), with the inhibition of DPPH radical from 15 to 82 %, at concentrations from 5 to 50 $\mu\text{g/mL}$, and also by the β -carotene bleaching assay, which showed a high inhibition of 85.2 ± 6.8 %, corresponding to about 80 % of the inhibition of Trolox (93.4 ± 0.7 %), used as a standard. The lethal dose (LD_{50}) of the oil was determined in $1673.84 \text{ mg mL}^{-1}$.

Conclusion: The results confirmed that the oil of *L. origanoides* could be utilized for the prevention of food bacterial growth, and as an antioxidative agent for retardation of food oxidation process. The oil has low toxicity, allowing its application in the food industry.

Keywords: Antioxidant and antibacterial activity, Toxicity, Essential oil composition, Carvacrol and thymol

Background

Modern techniques of production and conservation of food (high hydrostatic pressure, electromagnetic pulses, active packaging or modified atmosphere systems, natural antimicrobial compounds and biopreservation) have been developed. However, the food security remains an important issue of public health and economics to human society [1]. The growth of pathogenic bacteria and

fungi in food can affect its preservation, causing emerging food-borne diseases in different regions of the world. This situation is particularly relevant due to the increased resistance of microorganisms to antimicrobial agents currently used in food preservation. Moreover, the oxidation of lipids in food products can result in the emergence of rancidity and spoilage. Thus, affecting its nutritional quality and giving rise to potentially toxic oxidation products that are not acceptable for the human consumption [2].

The uses of chemical preservatives have been the conventional approach to improving food safety and reducing the oxidation process risks. However, parts of the

* Correspondence: gmaia@ufpa.br

²Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia, Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém 68135-110, PA, Brazil

³Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Pará, Belém 66075-110, PA, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article

waste left by these preservatives have shown some degree of toxicity [3]. These findings, along with consumer interest in natural food additives have strengthened the search for natural antioxidants [4]. In this context, the use of essential oils and natural antioxidants has become a promising field of research and potential use after the suspect that synthetic antioxidants such as butyl hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT) are potentially harmful to human health [5].

Spices have showed a diversity of volatile constituents with bioactive properties and, among these, many with significant antioxidant activity and use proven against the potential spoilage microorganisms of food [6]. For example, the *Lippia* (Verbenaceae) genus, widely distributed in Central and South America, and Tropical Africa, has presented many species used as food seasoning in different preparations [7]. *Lippia origanoides* Kunth, known in the northern region of Brazil as “salva-do-Marajó”, is a plant of pleasant odor used by local people as a food seasoning in substitution the oregano. Specimens of *L. origanoides* growing wild in areas of the Lower Amazon River, Brazil, have produced carvacrol-rich essential oils with antimicrobial activity against human pathogens of clinical importance [8, 9].

In the present study, the efficacy of the carvacrol-rich oil of *L. origanoides* was evaluated against food-borne bacteria, *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Salmonella typhimurium*, which often are involved in food spoilage process. In addition, the volatiles constituents of the oil were analyzed by GC and GC-MS, and its toxicity and antioxidant capacity were determined.

Materials and methods

Solvents and reagents

Solvents (dichloromethane and *n*-hexane) used for the chemical analysis of essential oil were supplied by Merck (Rio de Janeiro, Brazil). Culture media were obtained from Himedia (Mumbai, India). The drugs and reagents (Tween 80 and resazurin, anhydrous sodium sulfate, DPPH, β -carotene and linoleic acid) were obtained from Sigma-Aldrich and Sigma-Vetec (St. Louis, USA and Rio de Janeiro, Brazil). Ampicillin, the standard antimicrobial agent, was supplied by Cefar (São Paulo, Brazil).

Plant material

Leaves and thin stems (aerial parts) of *L. origanoides* were collected during the growing season, June 2012, in an experimental field of Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), Road Everaldo Martins (PA-457), km 26, municipality of Santarém, Pará State, Brazil. The geographical position of the sampled area was determined by GPS, resulting in the coordinates 02°30'870"S and 54°56'416" W, at an altitude of 52 m above sea level. The collections were performed at morning, 8 to 10 am.

Vouchers were deposited in the herbarium of Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora city, Minas Gerais state, Brazil, under the number CESJ-64029.

Extraction of the essential oil

Leaves and thin stems were air-dried and submitted to hydrodistillation using a Clevenger-type apparatus (100 g, 3 h). The oil was dried over anhydrous sodium sulfate, and its percentage content was calculated on the basis of the plant dry weight. The moisture contents of the samples were calculated using an Infrared Moisture Balance for water loss measurement. The procedure was performed in triplicate.

Oil composition analysis

Analysis of the oil was carried on Agilent Technology Equipments: a GC 6890 Plus Series coupled to a selective Mass Spectrometry Detector 5973 and an Auto Sampler 7863, under the following conditions: DB-5 ms (60 m \times 0.25 mm; 0.25 mm film thickness) fused-silica capillary column; programmed temperature, 50 °C (5 min in isothermal mode), 150 °C (4 °C/min plus 2 min in isothermal mode), 250 °C (5 °C/min plus 5 min in isothermal mode), 275 °C (10 °C/min plus 15 min in isothermal mode); injector temperature, 250 °C, injection type, split (1 μ L) and split flow adjusted to yield 30:1 ratio; carrier gas, helium, with an inlet pressure of 16.5 psi; EIMS, electron energy, 70 eV; temperature of the ion source and transfer line, 230 °C and 285 °C, respectively. The quantitative data regarding the volatile constituents were obtained by peak area normalization using a GC 6890 Plus Series, coupled to FID Detector, operated under similar conditions of the GC-MS system. The retention index was calculated for all the volatiles constituents using a homologous series of *n*-alkanes (C8–C32, Sigma-Aldrich).

Individual components were identified by comparison of both mass spectrum and GC retention data with authentic compounds that were analyzed and stored in a private library, as well as with the aid of commercial libraries containing retention indices and mass spectra of volatile compounds commonly found in essential oils [10, 11].

Antimicrobial assays

Microorganisms and culture conditions

The strains used in the antimicrobial assays were commercially purchased in the lyophilized form: *Salmonella typhimurium* (CCCD S004), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27953), *Bacillus cereus* (CCCD B001) and *Bacillus subtilis* (CCCD B005). The microorganisms were hydrated in nutrient broth (NB) at 37 ± 1 °C, for 24 h. The inocula were prepared by direct inoculation of colonies in 1 ml of sterile saline solution, adjusted to the

0.5 standards of the McFarland scale, corresponding to 1.5×10^8 UFC/ml [12].

Agar disk diffusion method

The antimicrobial activity of the oil was performed by a standard method of agar disc diffusion [12]. Mueller Hinton Agar (MHA) was used as a growth medium for microorganisms. Filter paper disks of 6 mm diameter, containing 10 μ l of the undiluted oil, were pressed lightly against the surface of the agar, which was previously seeded with the tested microorganisms. After 30 min at room temperature, the dishes were incubated at 37 ± 1 °C, for 24 h. At the end of the test period, the diameter of the inhibition zone formed over the agar was measured in millimeters. Ampicillin (10 μ g) was used as the positive standard. The test was performed in triplicate, and the values obtained were compared to the positive control.

Broth microdilution method

The determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) [13]. The initial test concentration was prepared by dissolving 10 μ l of oil in 1 ml of Tween 80 (1.0 %). From this stock solution, concentrations from 0.07 to 5.0 μ l/ml were equally prepared by serial dilution (dilution factor 1:1) using Mueller-Hinton Broth (MHB) as the solvent. The inoculum was standardized according to the scale of 0.5 MacFarland (dilution factor 1:10, sterile saline solution) to obtain the final concentration of 1.5×10^4 CFU/ml. The tests were performed in 96 well plates, where each well received 90 μ l of the specific concentration of oil, 90 μ l of sterile MHB and 20 μ l of the inoculum. Ampicillin (positive control) was diluted with sterile distilled water to obtain concentrations ranging from 0.1 to 46.9 μ g/ml. The microbial growth control, the control of sterility of the medium and the control of solvent were done simultaneously. Each well had a final volume of 200 μ l. The inhibition of growth of bacteria was revealed by the addition of resazurin sterile solution (20 μ l, 0.02 %, w/v) and re-incubation for 3 h. MIC, which is defined as the lowest concentration of oil capable of inhibiting the growth of microorganisms, was determined by the permanence of blue coloration in the wells. A change of color from blue to red (due to the reduction of dye) indicated the bacterial growth. The wells that showed no apparent growth were selected to evaluate the MBC, which was determined by the absence of microbial growth on plates containing MHA. The tests were performed in triplicate.

Antioxidant assay

The antioxidant activity of the *L. origanoides* oil was evaluated by DPPH radical scavenging assay and β -carotene

bleaching assay, using methodologies previously described, with some modifications [14].

DPPH radical scavenging assay

A stock solution of DPPH reagent (0.5 mM) was prepared in methanol. The solution was diluted with methanol (60 μ M approx.) to yield an initial absorbance of 0.62 ± 0.02 at 517 nm. The reaction mixture was composed of 1950 μ l of DPPH solution and 50 μ l of the oil, diluted with different proportions of methanol. For each sample, a methanol blank was also used. Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) was used as standard antioxidant. The absorbance was measured after 10 and 60 min for the samples and Trolox, respectively. The radical-scavenging activity was calculated by the DPPH-inhibition percentage according to the equation: $I\% = 100 (A-B)/A$, where A and B are the blank and sample absorbance values, at the end of the reaction. Linear regression determined the concentration of antioxidant required for 50 % scavenging of DPPH radicals (half-maximal effective concentration or EC_{50}). The analysis was performed in triplicate and the result presented as mean value \pm standard deviation.

β -carotene bleaching assay

A stock solution of β -carotene and linoleic acid mixture was prepared as following: 0.2 mg of β -carotene was dissolved in 1 ml of chloroform (HPLC grade) and, then, 20 μ l of linoleic acid and 265 μ l of Tween 40 were added. Chloroform was completely removed using a vacuum evaporator. Then, 100 ml of ultra-pure water, saturated with oxygen, was added with vigorous shaking. An aliquot of 2500 μ l of this reaction mixture was dispensed into test tubes. Portions of 200 μ l of the samples, prepared at 1.0 mg/l of ethanol were added, and the emulsion system was incubated at 50 °C. The same procedure was repeated with BHA, Trolox and the control (ethanol). The absorbance of these solutions was recorded and monitored at intervals of 15 min during 120 min, at 470 nm. The antioxidant activity (AA%) was calculated in terms of percent inhibition relative to the control using the Equation: $AA\% = [A_0 - A_{120}] / [B_0 - B_{120}] \times 100$, where A_0 , A_{120} , B_0 , and B_{120} are the absorbance of the sample and the control at the beginning and end of the reaction.

Acute toxicity (LD_{50})

Male Swiss mice were used, aged 60 ± 2 days, body mass index between 35 and 47 g. Mice were divided into six groups of twelve. Each group fasted for 12 h received oral doses of the oil between 100 and 3000 mg kg^{-1} according to the body weight of each animal. Initially, the animals were placed in cages and observed for 4 h to analyze the following characteristics: aggressiveness, motor activity

and lethargy, lack of appetite, runny nose, piloerection, urination, diarrhea, and convulsions. Then, the animals were observed for an additional period of 24, 48 and 72 h, and remained under the same conditions (food and water *ad libitum*, controlled temperature (24 ± 2 °C), 12 h light/dark cycle) for 14 days to check possible occurrence of death. A separate group of animals served as a control group. The LD₅₀ was calculated by semi-logarithmic interpolation, placing the values corresponding to the probabilistic percentage of deaths in ordinate axis and the doses administered, in the abscissa axis [15].

Statistical analyses

The data were subjected to analysis of variance (ANOVA) and the differences between means were determined by Tukey test ($p \leq 0.05$), using GraphPad Prism 5.0 and StatPlus 2009.

Results and discussion

Oil composition

The yield content of the oil of *L. origanoides* was 1.3 %, and it was analyzed by GC and GC-MS. Thirty-three volatile constituents were identified, and they are listed in Table 1. Carvacrol (47.2 %), thymol (12.8 %), *p*-cymene (9.7 %) and *p*-methoxythymol (7.4 %) were the main components.

The seasonal variation of the essential oil of a specimen of *L. origanoides* that occurs in lower Amazon River, the same sampling area of this study, was recently reported [9]. The main constituents found were carvacrol (rainy season: 43.5 %, dry season: 41.4 %), thymol (rainy season: 10.7 %, dry season: 10.6 %), *p*-cymene (rainy season: 9.8 %, dry season: 10.0 %) and *p*-methoxythymol (rainy season: 9.6 %, dry season: 10.4 %). Therefore, with a very similar oil composition.

Some chemotypes for the oil of *L. origanoides* have been described. The leaf oils of three specimens occurring in the localities of Cabeceiras, Campo Maior and José de Freitas, Piauí state, Brazil, showed similar composition with carvacrol as the major component (*ca.* 43 %) [16]. *Lippia schomburgkiana* Schauer, a synonymous species of *L. origanoides* Kunth, collected in Anapurus, Maranhão state, Brazil, yielded an oil dominated by 1,8-cineole (64.1 %) [17]. The oil obtained from a specimen sampled in Oriximiná, Pará state, Brazil, also presented carvacrol (*ca.* 38 %) as the main constituent [8]. Oils from three specimens that grow in the Departments of Santander, Cauca, Nariño and Boyacá, Colombia, have showed different composition: (1) oil with predominance of thymol (*ca.* 56 %), (2) an oil dominated by carvacrol (*ca.* 40 %), and (3) oil where *p*-cymene (12 %) was the principal constituent [18]. Finally, an oil rich in (*E*)-methyl cinnamate (52.4 %) and (*E*)-nerolidol (23.2 %) was reported for a specimen of *L.*

Table 1 Oil composition (%) of *Lippia origanoides*

N°	Constituents	RI _{Calc.}	RI _{Lit.}	Oil %
01	(<i>Z</i>)-Hexen-3-ol	854	859	0.2
02	α-Thujene	926	924	0.6
03	α-Pinene	934	932	0.4
04	1-Octen-3-ol	976	974	0.1
05	Myrcene	990	988	1.1
06	α-Terpinene	1016	1014	0.5
07	<i>p</i>-Cymene	1025	1020	9.7
08	Limonene	1026	1024	0.2
09	1,8-Cineole	1032	1026	1.3
10	γ-Terpinene	1056	1054	0.2
11	Linalool	1098	1095	2.9
12	Umbellulone	1169	1167	0.3
13	Terpinen-4-ol	1176	1174	1.5
14	Thymol methyl ether	1234	1232	1.3
15	Thymol/carvacrol isomer (MW = 150)	1282		0.4
16	Thymol	1292	1289	12.8
17	Carvacrol	1299	1298	47.2
18	Thymol acetate	1351	1349	0.4
19	Carvacrol acetate	1372	1370	0.6
20	Geranyl acetate	1382	1379	0.6
21	(<i>E</i>)-Caryophyllene	1418	1416	2.3
22	<i>trans</i> -α-Bergamotene	1434	1432	0.2
23	α-Humulene	1455	1452	0.3
24	<i>p</i>-Methoxythymol	1487	1484	7.4
25	β-Bisabolene	1506	1505	0.3
26	(<i>Z</i>)-α-Bisabolene	1508	1506	0.2
27	<i>p</i> -Methoxycarvacrol (tent.)	1555		1.3
28	Caryophyllene oxide	1584	1582	1.6
29	2-phenylethyl tyglate	1587	1584	0.2
30	Humulene epoxide II	1611	1608	0.2
31	α-Eudesmol	1656	1653	0.1
32	α-Bisabolol	1686	1685	0.2
33	Unidentified sesquiterpenes			1.2
Total				97.8

RI_{Calc.}: Retention index calculated on DB-5 ms capillary column, using a homologous series of *n*-alkanes (C₈-C₃₂). RI_{Lit.}: Retention index from literature [10]; Bold data: The main constituents of the oil.

origanoides with occurrence in the National Forest of Carajás, Parauapebas, Pará state, Brazil [19].

The genus *Lippia*, with more than fifty reported essential oils, is well known for its aromatic character [20]. *Lippia* species that occur in Brazil have shown a wide variation in the oil composition with the description of several chemotypes. *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br collected in Pará and Ceará states, with the types citral,

carvone and 1,8-cineole [21]; and *Lippia glandulosa* Schauer that grows wild in Roraima state, with the types thymol and β -caryophyllene [22]. Large amounts of thymol and carvacrol have been also identified in *Lippia gracilis* Schauer and *Lippia sidoides* Cham. from Northeast Brazil [23, 24].

Differences in essential oils composition can be attributed to the influence of phenological stage and the environmental factors for the plant collection sites. These phenomena may significantly alter the biochemical pathways and physiological processes that regulate the metabolism of the plant and, therefore, the biosynthesis of essential oils [25].

Antimicrobial activity

Some species of *Lippia* are known for essential oil production that exhibit antimicrobial potential. Among these, *L. chevalieri* Moldenke and *L. multiflora* Moldenke [26], *L. javanica* Spreng. [27], *L. sidoides* Cham. [23], *L. alba* (Mill.) N. E. Brown [28], *L. gracilis* Schauer [24], *L. palmieri* S. Wats [29] and *L. organoides* Kunth [9]. In the present study, the antimicrobial activity of a carvacrol-rich oil of *L. organoides* was evaluated against some food-borne bacteria, by using the methods of disk diffusion and microdilution broth. The diameter of microorganism growth inhibition zone, the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) are summarized in Table 2.

The oil of *L. organoides* exhibited significant antimicrobial activity ($p \leq 0.05$) when compared to positive control. The inhibition zone ranged from 27.9 to 50.9 mm, showing strong antimicrobial activity against the tested microorganisms, except for the bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, that it proved to be resistant to the oil. The largest zone of inhibition was observed for *Bacillus cereus* CCCD B001 (50.9 mm, 0.62 μ l/ml), followed by *Bacillus subtilis* CCCD B005 (35.8 mm, 1.25 μ l/ml) and *Salmonella typhimurium* CCCD S004

(27.9 mm, 1.25 μ l/ml). Also in this order, the strongest antibacterial activity of microorganisms tested. In general, the antimicrobial activity of essential oils is classified into different levels: weak activity (inhibition zone ≤ 12 mm), moderate activity (12 mm < inhibition zone < 20 mm) and strong activity (inhibition zone ≥ 20 mm) [30].

It is important to consider that the percentage of carvacrol and thymol in the oil of *L. organoides* is 60 %. The antimicrobial activity of carvacrol and thymol has been reported [31, 32]. Carvacrol and thymol are monoterpene phenols biosynthesized from γ -terpinene through *p*-cymene, and these latter compounds are always present in the same oil. The only difference in the formula of thymol and carvacrol is the position of the hydroxyl group on the phenyl ring [31]. However, independently of the position of the hydroxyl group, carvacrol and thymol have showed similar antimicrobial potential [31]. The mechanism of action of carvacrol and thymol involves the disruption of the cell membrane and subsequent escape of cytoplasmic contents [33]. In Gram-negative bacteria, carvacrol and thymol provoke the disintegration of the external membrane, liberating lipopolysaccharides and increasing the permeability of the cytoplasmic membrane [2].

In the analysis of antimicrobial agents, the plants can have advantages compared to synthetic drugs because many of its constituents can have similar biological effects, acting synergistically and increasing its therapeutic effect. The antimicrobial activity of essential oils may depend on only one or two of the major constituents that make up the oil. Synergism (partial or total) between carvacrol and thymol has been reported to control the growth of microorganisms [34]. However, evidence indicate that the inherent activity of essential oils may not depend exclusively on the ratio in which the main active constituents are present, but also from the interactions between these and the minor constituents in the oils [1]. For example, *p*-cymene (biosynthetic precursor of carvacrol

Table 2 Results of antibacterial activity of the oil of *L. organoides* against food-borne bacteria

Bacteria	Oil			Ampicillin		
	DD (mm) 10 μ l	MIC μ L/ml	MBC μ L/ml	DD 10 μ g	MIC μ g/ml	MBC μ g/ml
<i>Salmonella typhimurium</i> CCCD S004	27.9 \pm 0.4*	1.25	10	19.1 \pm 0.2	1.5	2.9
<i>Bacillus cereus</i> CCCD B001	50.9 \pm 0.6*	0.62	>20	23.4 \pm 0.2	1.5	5.8
<i>Bacillus subtilis</i> CCCD B005	35.8 \pm 0.3*	1.25	1.25	21.0 \pm 0.2	0.18	0.18
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27953	na	nt	nt	na	nt	nt

* $p \leq 0,05$ - Significance relative to the control; DD disk diffusion; MIC Minimum Inhibitory Concentration; MBC Minimum Bactericidal Concentration; na not active; nt not tested

and thymol), which occurs in the oil of *L. origanoides* with 9.7 %, is not an efficient antimicrobial agent when used alone, but together carvacrol and thymol it can potentiate the action of the oil to promoting the cytoplasmic membrane expansion and facilitating the antimicrobial action of these monoterpene phenols [31]. In addition, linalool (monoterpene alcohol, 2.9 % in the oil) can also contribute synergistically to the antibacterial activity of the oil of *L. origanoides* since it has previously proven its antimicrobial action [35].

Thus, the above results have highlighted the effectiveness of the oil of *L. origanoides* against microorganisms that are often involved in the deterioration and/or contamination of food.

Antioxidant activity

In present work, the antioxidant activity of the oil of *L. origanoides* was evaluated by two different assays: DPPH radical scavenging and β -carotene bleaching. The oil interacted with the DPPH by transfer of electron or hydrogen, neutralizing its free radical character [14]. The oil was able to promote the scavenging of DPPH radical, displaying a high dose–response ($r^2 = 0.92$), with inhibition varying from 15 to 82 %, at concentrations from 5 to 50 $\mu\text{g/ml}$. The half-maximal effective concentration (EC_{50}) was $23.0 \pm 1.5 \mu\text{g/ml}$, calculated by linear regression ($p < 0.05$), representing a significant antioxidant activity and comparable to the standard Trolox ($3.0 \pm 0.3 \mu\text{g/ml}$), as can be seen in Table 3. EC_{50} values lower than 30 $\mu\text{g/ml}$ indicates a significant potential for radical scavenging [36].

The β -carotene bleaching assay has evaluated by inhibiting the activity of free radicals generated during linoleic acid peroxidation, in the presence of the oil. The rate of β -carotene bleaching was slowed down in the

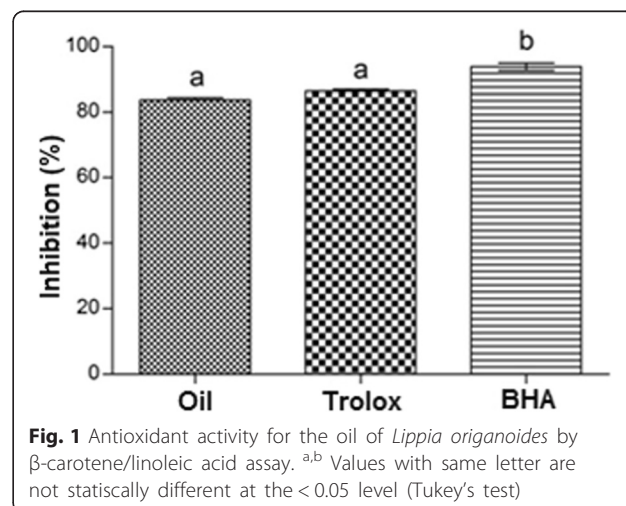
presence of the oil. Thus, it was possible to evaluate the antioxidant activity of the oil of *L. origanoides* in comparison with the synthetic antioxidants BHA and Trolox. The reaction was monitored for 120 min and inhibition of oil oxidation was $85.2 \pm 6.8 \%$. This value was about 80 % of the inhibition value observed for Trolox ($93.4 \pm 0.7 \%$). The ability of the oil of *L. origanoides* to protect the discoloration of β -carotene about Trolox and BHA is displayed in Fig. 1. These results are comparable to those obtained for the oils of *Satureja spicigera* (C. Koch) Boiss. (carvacrol 42.5 %) and *S. cuneifolia* Ten. (carvacrol 67.1 %), that had promoted the inhibition of 81.7 and 93.7 %, respectively when used the β -carotene bleaching assay [37].

The antioxidant activity of a carvacrol-rich oil of *L. origanoides*, collected in the Department of Santander, Colombia, using the ABTS radical cation, was previously reported [38], and this oil showed less activity in comparison with synthetic antioxidants as BHA and α -tocopherol, as well high activity when faced to BHT. Also, another carvacrol-rich oil of *L. origanoides* cultivated in Feira de Santana, Bahia state, Brazil, showed that plants in growth stage have displayed better antioxidant activity than grown plants [39].

The antioxidant action is a complex process that is usually occurring by various mechanisms. Thus, the result of a single assay for essential oil can give only a relative suggestion of its antioxidant properties in food matrices and must be interpreted with some caution. Moreover, the essential oil is a complex chemical mixture, composed of tens of components with different functional groups, polarity, and chemical behavior. Thus, depending on the used test, this can lead to diverse results and the difficulty to explain the activity described above [40]. For this reason, the DPPH radical and β -carotene bleaching assays were used in analyzing the antioxidant activity of the oil of *L. origanoides* and,

Table 3 Antioxidant activity of essential oil of *L. origanoides* in DPPD assay

Samples	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Inhibition (%)	EC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
Oil	50.0	81.5 ± 4.9	23.0 ± 1.5
	40.0	73.6 ± 3.5	
	30.0	68.0 ± 4.9	
	20.0	54.5 ± 2.6	
	10.0	31.6 ± 0.9	
	5.0	15.1 ± 3.5	
	5.0	80.3 ± 5.4	
Trolox	4.0	64.2 ± 4.6	3.0 ± 0.3
	3.0	53.8 ± 4.6	
	2.0	36.4 ± 5.2	
	1.0	17.2 ± 2.2	



as seen above, the results of both tests were effective and complementary.

Acute toxicity

The determination of lethal dose has indicated low toxicity (LD_{50} , 1673.84 mg kg⁻¹) to the oil of *L. origanoides*. In the first 4 h of observation, only those animals that received a dose of 3000 mg kg⁻¹ exhibited lethargy and piloerection. In the other doses tested, no change was observed in the physiological or behavioral parameters. In a previous study, physiological or behavioral changes in mice were not observed, after oral administration of the oil at doses of 30, 60 and 120 mg kg⁻¹ [41].

Conclusion

The essential oil of *L. origanoides* was efficient in the control of the growth of microorganisms as a natural antioxidant product. The results confirm the alternative use of the oil in the prevention of foodborne bacteria, as well as an agent to promote delay in the oxidation process. Therefore, the oil could have a viable application as a food preservative, assisting in the control of contamination by microorganisms and the oxidation process of processed foods.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

SLFS, RHVM research design; FRGS botanical species identification; SLFS, RHVM, LAS, JDAR, RBO research conduction; SLFS, RHVM, RBO, JKRS, JGSM data analyzing and manuscript preparation. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors are grateful to CNPQ/Bionorte, CAPES/Pró-Amazônia, CAPES/CSV-PVE and FAPESPA/PA for their financial support.

Author details

¹Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal, Universidade Federal do Amazonas, Manaus 60077-000, AM, Brazil. ²Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia, Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém 68135-110, PA, Brazil. ³Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Pará, Belém 66075-110, PA, Brazil. ⁴Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora 36036-330, MG, Brazil.

Received: 7 September 2015 Accepted: 28 October 2015

Published online: 09 November 2015

References

- Hyltdgaard M, Mygind T, Meyer RL. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Front Microbiol.* 2012;3:1–24.
- Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *Int J Food Microbiol.* 2004;94:223–53.
- Oke F, Aslim B, Ozturk S, Altundag S. Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja cuneifolia* Ten. *Food Chem.* 2009;112:874–9.
- Yanishlieva NV, Marinova EM, Gordon MH, Raneva VG. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chem.* 1999;64:59–66.
- Roby MH, Sarhan MA, Selim KA-H, Khalel KI. Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). *Ind Crops Prod.* 2013;44:437–45.
- Arora DS, Kaur J. Antimicrobial activity of spices. *Int J Antimicrob Ag.* 1999;12:257–62.
- Fabri RL, Nogueira MS, Moreira JR, Bouzada MLM, Scio E. Identification of antioxidant and antimicrobial compounds of *Lippia* species by bioautography. *J Med Food.* 2011;14:840–6.
- Oliveira DR, Leitão GG, Bizzo HR, Lopes D, Alviano DS, Alviano CS, et al. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K. *Food Chem.* 2007;101:236–40.
- Sarrazin SLF, da Silva LA, de Assunção APF, Oliveira RB, Calao VYP, da Silva R, et al. Antimicrobial and seasonal evaluation of the carvacrol-chemotype oil from *Lippia origanoides* Kunth. *Molecules.* 2015;20:1860–71.
- Adams RP. Identification of essential oil Components by gas chromatography/mass spectrometry. 4th ed. Carol Stream: Allured Publ. Corp; 2007.
- NIST - National Institute of Standards and Technology. Mass Spectral Library (NIST/EPA/NIH). Gaithersburg: The NIST Mass Spectrometry Data Center; 2005.
- NCCLS/CLSI - National Committee for Clinical Laboratory Standards/Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Document M2-A9 - approved standard. Wayne: EUA; 2006.
- NCCLS/CLSI - National Committee for Clinical Laboratory Standards/Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Document M2-A8 - Approved standard. CLSI, Wayne, Pennsylvania, USA: 2006 & 2004.
- da Silva JKR, Andrade EHA, Guimarães EF, Maia JGS. Essential oil composition, antioxidant capacity and antifungal activity of *Piper divaricatum*. *Nat Prod Commun.* 2010;3:477–80.
- Miller LC, Tainter ML. Estimation of the LD_{50} and its error by means of logarithmic probit graph paper. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1994;57:261–4.
- Santos FJB, Lopes JAD, Cito AMGL, Oliveira EH, Lima SG, Reis FAM. Composition and biological activity of essential oil from *Lippia origanoides* HBK. *J Essent Oil Res.* 2004;16:504–6.
- Silva NA, da Silva JKR, Andrade EHA, Carreira LMM, Sousa PJC, Maia JGS. Essential oil composition and antioxidant capacity of *Lippia schomburgkiana*. *Nat Prod Commun.* 2009;4:1281–6.
- Stashenko EE, Martínez JR, Ruiz CA, Arias G, Durán C, Salgar W, et al. *Lippia origanoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. *J Sep Sci.* 2010;33:93–103.
- Ribeiro AF, Andrade EHA, Salimena FRG, Maia JGS. Circadian and seasonal study of the cynnamate chemotype from *Lippia origanoides* Kunth. *Biochem Syst Ecol.* 2014;2014(55):249–59.
- Pascual ME, Slowing K, Carretero E, Mata DS, Villar A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: A review. *J Ethnopharmacol.* 2001;76:201–14.
- Zoghbi MGB, Andrade EHA, Santos AS, Silva MHL, Maia JGS. Essential oils of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. growing wild in the Brazilian Amazon. *Flav Fragr J.* 1998;13:47–8.
- Maia JGS, Silva MHL, Andrade EHA, Carreira LMM. Essential oil variation in *Lippia glandulosa* Schauer. *J Essent Oil Res.* 2005;17:676–80.
- Botelho MA, Nogueira NAP, Bastos GM, Fonseca SGC, Lemos TLG, Matos FJA. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. *Braz J Med Biol Res.* 2007;40:349–56.
- Neto RM, Matos FJA, Andrade VS, Melo MCM, Carvalho CBM, Guimarães SB. The essential oil from *Lippia gracilis* Schauer, Verbenaceae, in diabetic rats. *Rev Bras Farmacogn.* 2010;20:261–6.
- Sangwan NS, Farooqi AHA, Shabih F, Sangwan RS. Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regul.* 2001;34:3–21.
- Bassole IHN, Ouattara AS, Nebie R, Ouattara CAT, Kabore ZI, Traore AS. Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso. *Phytochemistry.* 2003;62:209–12.
- Viljoen AM, Subramoney S, van Vuuren SF, Baser KHC, Demirci B. The composition, geographical variation and antimicrobial activity of *Lippia javanica* (Verbenaceae) leaf essential oils. *J Ethnopharmacol.* 2005;96:271–7.
- Aguar JS, Costa MCCC, Nascimento SC, Sena KXFR. Atividade antimicrobiana de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). *Rev Bras Farmacogn.* 2008;18:436–40.
- Ortega-Nieblas MM, Robles-Burgeno MR, Acedo-Félix E, González-Léon A, Morales-Trejo A, Vázquez-Moreno L. Composición química e actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano (*Lippia palmieri* S. Wats). *Rev Fitotec Mex.* 2011;34:11–7.

30. Rota MC, Herrera A, Martínez RM, Sotomayor J, Jordán MJ. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control*. 2008;19:681–7.
31. Ultee A, Bennik MHJ, Moezelaar R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol*. 2002;68:1561–8.
32. Baser KHC. Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. *Curr Pharm Design*. 2008;14:3106–20.
33. Lambert RJW, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas G-JE. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J Appl Microbiol*. 2001;91:453–62.
34. Didry N, Dubreuil L, Pinkas M. Antimicrobial activity of thymol, carvacrol and cinnamaldehyde alone or in combination. *Pharmazie*. 1993;48:301–4.
35. Hussain AI, Anwar F, Sherazi STH, Przybylski R. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chem*. 2008;108:986–95.
36. Ramos A, Visozo A, Piloto J, Garcia A, Rodríguez CA, Rivero R. Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in Cuban medicinal plants. *J Ethnopharmacol*. 2003;87:241–6.
37. Eminagaoglu O, Tepe B, Yumrutas O, Akpulat HA, Daferera D, Polissiou M, et al. The in vitro antioxidative properties of the essential oils and methanol extracts of *Satureja epicigera* (K. Koch.) Boiss. and *Satureja cuneifolia* Ten. *Food Chem*. 2007;100:339–43.
38. Acevedo AM, Castañeda ML, Blanco KM, Cardenas CY, Reyes JA, Kouznetsov V, et al. Composición e capacidad antioxidante de especies aromáticas y medicinales com alto contenido de timol e carvacrol. *Scientia et Technica*. 2007;XIII:33.
39. Teles S, Pereira JA, de Oliveira LM, Malheiro R, Lucchese AM, Silva F. *Lippia origanoides* H. B. K. essential oil production, composition, and antioxidant activity under organic and mineral fertilization: Effect of harvest moment. *Ind Crops Prod*. 2014;60:217–25.
40. Ruberto G, Baratta MT. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chem*. 2000;69:167–74.
41. Andrade VA, Almeida AC, Souza DS, Colen KJF, Macêdo AA, Martins ER, et al. Antimicrobial activity and acute and chronic toxicity of the essential oil of *Lippia origanoides*. *Pesq Vet Bras*. 2014;34:1153–61.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Article

Antimicrobial and Seasonal Evaluation of the Carvacrol-Chemotype Oil from *Lippia origanoides* Kunth.

Sandra Layse F. Sarrazin ¹, Leomara Andrade da Silva ², Ana Paula F. de Assunção ², Ricardo B. Oliveira ², Victor Y. P. Calao ², Rodrigo da Silva ², Elena E. Stashenko ³, José Guilherme S. Maia ^{2,4,*} and Rosa Helena V. Mourão ^{1,2,*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal, Universidade Federal do Amazonas, 60077-000 Manaus, Brazil; E-Mail: sarrazin@ufpa.br

² Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia, Universidade Federal do Oeste do Pará, 68135-110 Santarém, Brazil; E-Mails: Andrade.biologia@hotmail.com (L.A.S.); anapaula_itb@hotmail.com (A.P.F.A.); rbo@ufpa.br (R.B.O.); vyperez@gmail.com (V.Y.P.C.); rsilvf@yahoo.com.br (R.S.)

³ Chromatography Laboratory, Research Center for Biomolecules, Industrial University of Santander, Bucaramanga 57, Colombia; E-Mail: elena@tucan.uis.edu.co

⁴ Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Federal do Pará, 66075-110 Belém, Brazil

* Authors to whom correspondence should be addressed; E-Mails: gmaia@ufpa.br (J.G.S.M.); mouraorhv@yahoo.com.br (R.H.V.M.); Tel.: +55-91-98146-7067 (J.G.S.M.); +55-93-98101-3967 (R.H.V.M.).

Academic Editor: Isabel Ferreira

Received: 9 December 2014 / Accepted: 14 January 2015 / Published: 23 January 2015

Abstract: This study evaluated the influence of seasonal variation on the yield and composition of essential oil of *Lippia origanoides* occurring in the Middle Rio Amazonas, Brazil, and the impact on its antimicrobial potential. The average oil yield was $1.7\% \pm 0.2\%$ in the rainy season and $1.6\% \pm 0.3\%$ in the dry season. Some correlations with climatic parameters were observed. The major components were carvacrol (rainy, $43.5\% \pm 1.9\%$; dry, $41.4\% \pm 2.04\%$), thymol (rainy, $10.7\% \pm 1.1\%$; dry, $10.6\% \pm 0.9\%$), *p*-cymene (rainy, $9.8\% \pm 0.7\%$; dry, $10.0\% \pm 1.4\%$) and *p*-methoxythymol (rainy, $9.6\% \pm 0.8\%$; dry, $10.4\% \pm 1.4\%$). It was found that the antibacterial activity of *L. origanoides* against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* was little influenced by the changes in oil composition due to seasonal variation. Against *S. aureus*, the oil Minimum Inhibitory Concentration (MIC) value was

1.25 µL/mL over ten months. Against *E. coli*, the oil MIC values ranged from 0.15 µL/mL to 0.31 µL/mL in different months of the year. The Minimum Bactericidal Concentration (MBC) value was 2.5 µL/mL against *S. aureus* and 1.25 µL/mL against *E. coli*. The results suggest that the antimicrobial activity identified in the oil remain unchanged for the full year, allowing its medicinal use without any risk of loss or absence of the active principles of the plant.

Keywords: *Lippia origanoides*; Verbenaceae; salva-do-marajó; essential oil composition; seasonal variation; antimicrobial evaluation

1. Introduction

Lippia origanoides Kunth, known in northern Brazil as “salva-do-marajó” and “alecrim-d’angola”, is a shrubby species with a perennial life cycle, whose aerial parts are used in cooking as a flavoring of regional dishes, in the treatment of gastrointestinal disorders, respiratory diseases, and as an antiseptic for mouth and throat irritation. This species is also called oregano in Mexico and used as a substitute for *L. graveolens* Kunth and *Origanum vulgare* L., the Mexican and Greek oreganos, respectively [1–3].

The production of chemical components in plant species is influenced by external factors such as soil quality and climatic conditions. The yield of an essential oil and its composition are susceptible to quantitative and qualitative variations and consequently the biological activity of this oil is dependent on its composition and similarly will be subject to variations in its potency [4,5]. Thus, plants sampled in different seasons may have different compositions and consequently contain or not specific bioactive constituents [6].

The oil composition of *L. origanoides* occurring in the Brazilian and Colombian Amazon has shown significant variation based on its main constituents. It is represented by different chemical types as already described: *p*-cymene, α - and β -phellandrene and limonene (chemotype A) [7], carvacrol (chemotype B) [2,3], thymol (chemotype C) [7,8], 1,8-cineole (chemotype D) [9], and lately (*E*)-methyl cinnamate and (*E*)-nerolidol (chemotype E) [10].

The bioactivity of the essential oils produced from *L. origanoides* has been evaluated. They showed antimicrobial activity against some pathogenic microorganisms [2,3,11–14], repellent activity against pests living in stored grains such as *Sitophilus zeamais* and *Tribolium castaneum* [15,16], an inhibitory effect on yellow fever virus replication *in vitro* [17], antiprotozoal activity against *Leishmania chagasi* and *Trypanosoma cruzi* [18,19], and DNA protective effects against bleomycin-induced genotoxicity [20]. The composition of the oil of *L. origanoides* and its antioxidant activity were analyzed after cultivation and mineral fertilization [21]. These qualities give to the plant a biological potential for its use as medicine in the control of some infectious diseases, in association to its essential oil that also possesses important properties of significant interest in the cosmetics and food markets.

The present study investigated for one year the influence of seasonal variation on the yield and composition of essential oil from fresh leaves and thin stems of *L. origanoides* collected in the municipality of Santarém, Pará State, as well as the variation in the antimicrobial potential of these oils,

in order to obtain biological data that would allow a better utilization of the plant for therapeutic and medicinal purposes.

2. Results and Discussion

2.1. Effect of Seasonal Variation in Oil Yield

Parameters such as temperature, solar radiation, precipitation and air relative humidity were measured during the sampling period of *L. origanoides* to verify the possible influence of seasonal variation in the oil yield. The results are shown in Figure 1.

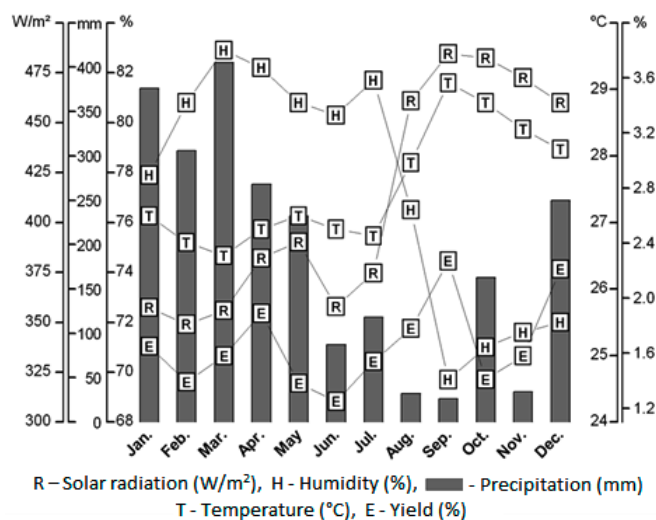


Figure 1. Yields (%) of the essential oil of *L. origanoides* and climatic variables measured at the time of collection: precipitation (mm); solar radiation (W/m²); relative humidity (%) and temperature (°C).

The Brazil Northern region is characterized by two distinct seasons: the rainy season, between December and May, and the dry season, between June and November. In 2012, the average values of temperature and solar radiation, between January and December, ranged from 26.44 °C to 29.06 °C and 357.86 W/m² to 484.59 W/m², respectively. The average relative humidity and the precipitation ranged from 69.69% to 82.88% and from 26.2 mm to 405.3 mm, respectively. The observed precipitation in January, February and March, was higher when compared to the other months of the year. On the other hand, the temperature remained almost constant, with a minimum in March (26.44 °C) and maximum in September (29.06 °C).

The oil yield ranged from 1.3% to 2.3% over twelve months, with a mean of 1.7% ± 0.2% in the rainy season and 1.6% ± 0.3% in the dry season. The month of sampling did not affect the average oil yield ($p > 0.05$). These results are consistent with studies published by Rojas and colleagues [8], who also observed an average yield of 1.1% for the oil of *L. origanoides* collected in Merida, Venezuela, in both seasons. In this study, correlations were observed when comparing the oil yields and climatic parameters measured during the collection of the plant. The oil yield was directly proportional to increased solar radiation and temperature and inversely proportional to the air relative humidity rate (see Table 1). According to Castelo and colleagues [22], essential oils play an important role in plant defense against

harsh environmental conditions. For example, high temperatures can promote change in the activity of the stomata of leaves, thus reducing volatilization of these oils.

Table 1. Correlation between the oil yield of *L. origanoides* with the solar radiation, temperature and relative humidity, in the collection area.

Environmental Factors	Correlation Coefficient (r ²)
Temperature (°C)	0.49 *
Air relative humidity (%)	−0.49 *
Radiation (W/m ²)	0.51 **

* Significant at $p \leq 0.1$; ** Significant at $p \leq 0.05$.

2.2. Effect of Seasonal Variation in Oil Composition

The oils extracted from the plants collected in the period from January to December 2012 were analyzed by GC and GC-MS. Individual components were identified by comparison of both mass spectrum and GC retention data with authentic compounds, which were previously analyzed and stored in the data system, as well as with the aid of commercial libraries containing retention indices and mass spectra of volatile compounds, commonly found in essential oils [23,24]. The identified constituents are listed in Table 2.

Thirty-seven constituents were identified in the twelve analyzed oils, accounting for an average of 92% to 99% of the total. According to seasonal period, the main constituents were carvacrol (rainy season, 43.5% ± 1.9%, dry season, 41.4% ± 2.04%, $p < 0.05$), thymol (rainy season, 10.7% ± 1.1%, dry season, 10.6% ± 0.9%, $p > 0.05$), *p*-cymene (rainy season, 9.8% ± 0.7%, dry season, 10.0% ± 1.4%, $p > 0.05$) and *p*-methoxythymol (rainy season, 9.6% ± 0.8%, dry season, 10.4% ± 1.4%, $p < 0.05$). The amount of carvacrol, the major component, in the oils of the two seasons showed a small difference, about 2%, with no statistical significance. The four major components (carvacrol, thymol, *p*-cymene and *p*-methoxythymol) showed a higher percentage in April, with a total of 78.6%. Some constituents with low-percentage content were shown to be present or absent according to the month of collection. In addition, a greater number of components was identified in the oil of May 2012.

Differences in essential oil composition under the influence of phenological stage or environmental factors have been reported. For example, in *Satureja* species from the Mediterranean region, carvacrol was the main component during the flowering period, and thymol for most of the year except winter, where γ -terpinene showed predominance [25]. Thus, the phenological stage and environmental factors can change in a significant manner the biochemical pathways and physiological processes that alter the plant metabolism and, therefore, the essential oil biosynthesis [26,27].

The genus *Lippia*, with more than fifty reported essential oils, is well known for its aromatic character [1,28]. Furthermore, the *Lippia* species that occur in Brazil have shown a wide variation in the oil composition with the description of several chemotypes, such as *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br collected in Pará and Ceará with citral, carvone and 1,8-cineole types [29,30]; *Lippia lupulina* Cham. existing in Mato Grosso state with terpinen-4-ol, 1,8-cineole + β -caryophyllene, and germacrene D + β -caryophyllene + bicyclgermacrene types [31]; *Lippia grandis* Schauer with occurrence in all Amazon Region with thymol, 1,8-cineole and carvacrol types [32,33]; and *Lippia glandulosa* Schauer that grows in Roraima with thymol and β -caryophyllene types [34].

Table 2. Yield and essential oil composition of *L. origanoides* collected from January to December 2012.

Month/Oil Yield			Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec
			1, 7 *	1, 4 *	1, 6 *	1, 9 *	1, 4 *	1, 3 *	1, 5	1, 8	2, 3	1, 4	1, 6 *	2, 2 *
Constituents	RI _{Calc.}	RI _{Lit.}	Oil %											
(Z)-Hexen-3-ol	854	859	-	0.2	0.4	-	0.2	0.2	0.2	0.3	0.3	-	-	0.3
α-Thujene	926	924	0.7	0.6	0.7	0.7	0.5	0.6	0.8	0.7	0.7	0.8	0.9	0.6
α-Pinene	934	932	0.6	0.4	0.4	0.4	0.3	0.4	0.4	0.5	0.5	0.6	0.7	0.5
1-Octen-3-ol	976	974	0.1	0.2	0.3	0.1	0.3	0.1	0.2	0.2	-	-	-	-
β-Pinene	978	976	0.2	0.2	0.1	-	0.1	-	-	0.2	0.2	0.2	0.3	0.2
Myrcene	990	988	1.3	1.2	1.3	1.3	1.0	1.1	1.2	1.1	1.2	1.5	1.5	1.1
α-Terpinene	1016	1014	0.7	0.8	0.9	0.9	0.7	0.5	0.7	0.7	0.5	0.7	0.8	0.7
p-Cymene	1025	1020	11.2	9.6	10.5	10.2	8.5	9.7	9.6	7.9	9.5	11.8	11.5	8.9
Limonene	1026	1024	0.3	0.2	0.3	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3	0.2	0.2
1,8-Cineol	1032	1026	0.9	0.9	0.9	0.7	0.8	1.3	0.7	0.6	1.0	0.8	1.1	0.9
γ-Terpinene	1056	1054	1.3	2.0	1.6	1.7	1.7	0.2	1.7	1.5	0.1	1.9	1.1	0.8
Linalool	1098	1095	3.9	3.8	3.5	2.8	3.7	2.9	2.8	2.9	2.5	2.4	3.1	2.6
Ipsdienol	1144	1140	0.2	0.2	-	-	0.1	-	-	0.1	-	-	-	-
Umbellulone	1169	1167	0.1	0.3	0.2	0.3	0.3	0.3	0.4	0.5	0.1		0.3	0.3
Terpinen-4-ol	1176	1174	1.1	1.1	1.3	0.9	1.1	1	0.9	0.9	0.8	1.0	0.9	0.7
Thymol methyl ether	1234	1232	2.2	2	1.8	1.4	1.7	1.3	1.6	2.0	1.4	2.1	1.8	1.3
Thymol isomer (MW = 150)	1282	-	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	-	-	-	-	-
Thymol	1292	1289	9.0	10.3	12.5	11.7	11.7	12.8	11.8	11.5	9.8	9.3	8.2	9.2
Carvacrol	1299	1298	40.7	43.4	46.4	46.6	45.5	47.2	46.1	40.5	37.7	41.2	35.9	38.3
Thymol acetate	1351	1349	0.8	0.8	0.4	0.3	0.5	0.4	0.6	0.7	0.6	0.6	0.9	0.6
Carvacrol acetate	1372	1370	1.7	1.6	0.6	0.6	0.8	0.6	1.1	1.3	0.9	1.1	1.8	1.1
Geranyl acetate	1382	1379	0.4	0.4	0.3	0.3	0.4	0.6	0.4	0.6	0.6	0.5	0.7	0.8
(E)-Caryophyllene	1418	1416	3.4	3.5	2.5	2.6	3.4	2.3	2.1	2.8	2.7	2.9	4.8	4.6
trans-α-Bergamotene	1434	1432	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2	0.2	-	0.2	0.2
α-Humulene	1455	1452	0.4	0.4	0.3	0.3	0.4	0.3	0.2	0.3	0.3	0.3	0.5	0.5
p-Methoxythymol	1487	1484	8.8	8.4	7.3	10.1	8.8	7.4	8.4	10.1	12.8	10.4	13.3	14.1
β-Bisabolene	1506	1505	0.3	0.4	0.3	0.3	0.4	0.3	0.2	0.4	0.4	0.3	0.4	0.5
(Z)-α-Bisabolene	1508	1506	-	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	-	0.3	0.4	0.6	0.5	0.3
δ-Cadinene	1524	1522	-	-	-	-	0.1	-	-	-	-	-	0.2	0.2
trans-γ-Bisabolene	1531	1529	0.4	0.5	0.4	0.5	0.6	-	0.5	-	-	-	-	0.7
p-Methoxycarvacrol (tent.)	1555	-	2.8	2.5	1.1	1.2	1.6	1.3	1.6	2.3	2.7	2	3.7	3.1
Caryophyllene oxide	1584	1582	3	1.8	1.3	1.6	1.7	1.6	2.2	2.8	2.8	3.6	2	1.9
2-phenylethyl tyglate	1587	1584	0.3	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3	0.3	0.2	0.3	-
Humulene epoxide II	1611	1608	-	-	-	-	0.2	0.2	0.2	0.3	0.3	-	-	-
α-Cadinol	1655	1652	0.2	-	-	-	0.1	-	-	0.1	0.1	-	0.2	0.2
α-Eudesmol	1656	1653	-	-	-	-	0.1	0.1	-	0.1	0.2	-	0.2	0.2
α-Bisabolol	1686	1685	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	-	0.2	0.3
Unidentified sesquiterpenes	-	-	2.1	0.5	0.8	0.5	0.7	1.2	1.3	3.7	3.8	2.1	1.4	2.5
Total	-	-	97.8	99.0	98.8	99.0	98.7	96.1	97.7	93.1	92.0	96.1	98.2	95.9

RI_{Calc} = Retention Index on DB-5ms Column; RI_{Lit} = Retention index of literature (Adams, 2007) [23].

* Flowering period.

It is important to note that *Lippia origanoides* distributed by Central and South America also showed several chemotypes as mentioned previously. As in the present work, with oregano scent and the predominance of carvacrol in the oil, other specimens were identified in Piauí and Pará, Brazil, as well as in Santander, Colombia [2,3,7]. With also oregano smell, a thymol type was found in Merida, Venezuela, and regions of Cauca, Nariño and Boyacá, Colombia [7,8]. Another type with citric smell and significant content of α - and β -phellandrene, p-cymene, limonene and 1,8-cineole was also found in the Santander Region, Colombia [7]. *Lippia schomburgkiana*, a synonymous species of *L. origanoides*, with a fresh camphoraceous scent and existing in Maranhão, Brazil, showed another different type with the predominance of 1,8-cineole [9]. Recently, an oil of *L. origanoides* with occurrence in the Southern of Pará state, with fruity-woody odor and reminiscent of cinnamon, strawberry and wood, was reported [10]. The main constituents found in this oil were (*E*)-methyl cinnamate, (*E*)-nerolidol, p-cymene, 1,8-cineole, carvacrol, α -pinene, (*E*)-caryophyllene and γ -terpinene, showing a significant variation throughout the day and year. The authors have suggested that the environmental conditions of climate and the soil, which is covered by iron-manganese ore, could be contributing for this notable variation in oil composition. The temperature and relative humidity are lower in the Southern of Pará State. On the other hand, in the present specimen of *L. origanoides*, which was collected in Western Pará state, the oil composition did not vary significantly, which could be also attributed to the environmental conditions of climate and the soil, poor in mineral nutrients. The temperature and relative humidity are higher in Western Pará State.

2.3. Antimicrobial Activity of the Oil

The antimicrobial activity of *L. origanoides* oil on the bacteria *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* was previously reported [2,3]. In the present study, with the same microorganisms, it was found that the antibacterial activity of *L. origanoides* was little influenced by the changed composition of the oil due to seasonal variation. For both bacteria, different MIC values were observed in the 12 months of data collection, as seen in Table 3. Against *S. aureus*, the MIC value was 1.25 $\mu\text{L/mL}$ for the oils obtained within 10 months of the seasonal study, excepting March and May in which MIC value was 2.5 $\mu\text{L/mL}$. Against *E. coli*, the MIC value was 0.15 $\mu\text{L/mL}$ in March, May, June, July, September and October, and 0.31 $\mu\text{L/mL}$ in January, February, April, August, November and December. In all samples, the MBC values were 2.25 $\mu\text{L/mL}$ and 1.25 $\mu\text{L/mL}$ against *S. aureus* and *E. coli*, respectively.

Table 3. Antimicrobial potential of the essential oil of *L. origanoides* obtained in the seasonal study (January to December 2012).

	Bacteria	Concentration ($\mu\text{L/mL}$)											
		Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Set	Oct	Nov	Dec
MIC	<i>Staphylococcus aureus</i>	1.25	1.25	2.25	1.25	2.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
	<i>Escherichia coli</i>	0.31	0.31	0.15	0.31	0.15	0.15	0.15	0.31	0.15	0.15	0.31	0.31
MBC	<i>Staphylococcus aureus</i>	2.25	2.25	2.25	2.25	2.25	2.25	2.25	2.25	2.25	2.25	2.25	2.25
	<i>Escherichia coli</i>	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25

Studies have confirmed the influence of environmental factors as determinants of antimicrobial action of essential oils [35]. In the present work, no significant variation was observed in the

antimicrobial activity when compared to seasonal collection period. Moreover, only low correlation was detected when analyzing the values obtained in the tests of antimicrobial activity in relation to the percentage contents of the major components present in the oils of seasonal study, as can be seen in Table 4.

Table 4. Simple correlation between antimicrobial activity and the main constituents (carvacrol and thymol) of the oil of *L. origanoides*.

Bacteria (MIC)	Correlation Coefficient (r^2)	
	Carvacrol (%)	Thymol (%)
<i>Escherichia coli</i>	−0.411 *	−0.455 *
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.413 *	0.442 *

* Significant at $p \leq 0.1$.

The antimicrobial activity of the essential oil of *L. origanoides*, at least in part, must be associated with the presence of its major constituents, carvacrol and thymol [3,36]. These compounds exhibit high antimicrobial activity against different types of microorganisms and have been often studied in this context. Thus, Ultee and colleagues [37] have hypothesized that the hydroxyl group and the presence of a system of delocalized electrons are important for the antimicrobial activity of phenolic compounds, such as carvacrol and thymol. Furthermore, Ben Arja and colleagues [38] supported the hypothesis that the proton of the free hydroxyl is able to be distributed into the electronic system of the aromatic ring, enhancing the hydrophobic character of these compounds to allowing its accumulation in the cell membranes, causing its disintegration and death of the microorganisms. As for this biological action, it is clear that one cannot exclude the synergistic effect of the oil minor components.

Thus, based on the results of the seasonal study, the high yield of the oils analyzed, and the small variation in the content of carvacrol and thymol one could suggest that the antimicrobial activity identified in the aerial parts of *L. origanoides* will remain unchanged for the full year, allowing its medical use without any risk of loss or absence of any of the active principles of the plant.

3. Experimental Section

3.1. Plant Material

Leaves and thin stems (aerial parts) of *L. origanoides* were collected monthly from January to December 2012. Plant collection was performed in an experimental planting of the Federal University of Western Pará (UFOPA), identified as “Projeto Farmácia Viva” located on Highway Everaldo Martins, PA 457, Km 26, Municipality of Santarém, Pará State, Middle Amazon River, Brazil. The leaves and stems were sampled from clones of neighboring specimens, at the same growth stage, in order to minimize the phenological stage influence and the effects of light intensity, soil composition, and other environmental factors. The intermediate geographical position of the specimens was determined with GPS, resulting in the coordinates 02°30'870"S and 54°56'416"W, at an altitude of approximately 52 m above sea level. All collections were performed in the morning between 8 am and 10 am. Part of the collected material (180 g) was dried in an oven with air circulation (40 °C) until constant mass, whose data were used for calculation of the oil yield. Vouchers were deposited in the herbarium of Embrapa

Amazônia Oriental (IAN-184688), Belém city, Pará state, and the herbarium of Federal University of Juiz de Fora (CESJ-64029), Juiz de Fora city, Minas Gerais state, Brazil.

3.2. Climatic Data

Climatic factors such as temperature, solar radiation, relative humidity and rain precipitation were measured monthly from January to December 2012. Data were obtained from a meteorological station installed near the experimental planting. The equipment used was: Datalogger Model CR1000 (Campbell, North Logan, UT, USA) Thermo-hygrometer model HMP45C (Vaisala, Ventura, CA, USA) Pyranometer model LI200 (LI-Cor, Lincoln, NE, USA) and a Rain Gauge Model TR-525 (Texas Electronic, Dallas, TX, USA).

3.3. Plant Processing and Extraction of the Essential Oils

The aerial parts of the plant (leaves and thin stems) samples were air-dried, ground and submitted to hydrodistillation using a Clevenger-type apparatus (180 g, 3 h). The oils were dried over anhydrous sodium sulfate, and their percentage contents were calculated on the basis of the plants dry weight. The moisture contents of the samples were calculated using a scale with moisture measurement by infra-red, after phase separation using a Dean-Stark glass trap (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (5 g, 60 min), and toluene as the solvent phase. The procedure was performed in triplicate.

3.4. Oil-Composition Analysis

The analysis of the oils was carried on Agilent Technology (Santa Clara, CA, USA) equipment consisting of a 6890 Plus Series GC coupled to a selective Mass Spectrometry Detector 5973 and an Auto Sampler 7863, under the following conditions: DB-5ms (60 m × 0.25 mm; 0.25 mm film thickness) fused-silica capillary column; programmed temperature, 50 °C (5 min in isothermal mode), 150 °C (4 °C/min plus 2 min in isothermal mode), 250 °C (5 °C/min plus 5 min in isothermal mode), 275 °C (10 °C/min plus 15 min in isothermal mode); injector temperature, 250 °C, injection type, split (1 µL) and split flow adjusted to yield 30:1 ratio; carrier gas, helium, with an inlet pressure of 16.5 psi; EIMS, electron energy, 70 eV; temperature of the ion source and transfer line, 230 and 285 °C, respectively. The quantitative data regarding the volatile constituents were obtained by peak-area normalization using a GC 6890 Plus Series coupled to FID Detector, operated under similar conditions of the GC-MS system. The retention index was calculated for all the volatiles constituents using a homologous series of C₈–C₃₀ *n*-alkanes (Sigma-Aldrich), according the linear equation of Van den Dool and Kratz [39].

3.5. Antimicrobial Bioassay

3.5.1. Microorganisms and Inoculum Standardization

To monitor the variation of the antimicrobial potential of the *L. organoides* oil, due to possible seasonal fluctuations, the tests were made by the broth micro dilution method, in triplicate [40]. Two strains of microorganisms were used: *Escherichia coli* ATCC 25922 (Gram-negative) and

Staphylococcus aureus ATCC 25923 (Gram-positive). The microorganisms were commercially obtained in lyophilized form, rehydrated in nutrient broth (Becton/Difco, Franklin Lakes, NJ, USA) (24 h, 36 ± 1 °C) and then seeded in Petri dishes containing Mueller Hinton agar (Becton/Difco) (24 h, 36 ± 1 °C). The inocula (24 h) in sterile saline were prepared to achieve the turbidity standard of 0.5 in the McFarland scale, containing the suspensions approximately 1.5×10^8 CFU/mL.

3.5.2. Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

In this method, the inoculum was standardized according to the scale of 0.5 MacFarland. It was subjected to serial dilution (saline solution) to obtain the final concentration of 1.5×10^4 CFU/mL. The dilution of oil was done in solution of Tween 80 (1%) to obtain the test concentration (20 µL/mL) and then with serial dilution using Mueller-Hinton Broth (Becton/Difco), for the preparation of other concentrations. The tests were performed in 96 well plates, where each well received 90 µL of the specific concentration of the oil, 90 µL of Mueller Hinton broth (Himedia, Mumbai, India) and 20 µL of the inoculum. The control of microbial growth, control of sterility of the medium and the solvent control were done simultaneously. Each well had a final volume of 200 µL. The inhibition of growth of bacteria was revealed by addition of resazurin sterile solution (20 µL, 0.02%, w/v) (Vetec, São Paulo, Brazil), after incubation (24 h, 36 ± 1 °C). Then the plates were incubated for another 3 h. The MIC, which is defined as the lowest concentration of oil capable of inhibiting the growth of microorganisms, was determined by the permanence of blue coloration (resazurin) in the wells. The wells that showed no apparent growth were selected to evaluate the CBM, which was determined by the absence of microbial growth on plates containing agar MH [40].

3.6. Statistical Analysis

The climatic parameters, oil yield and antimicrobial activity were expressed as mean \pm standard deviation. Statistical significance was evaluated using the Tukey's test, considering as significant if $p \leq 0.05$ (GraphPad Prism software, La Jolla, CA, USA, version 3.0, 2009). Pearson correlation coefficients were calculated using Minitab 14 (software, State College, PA, USA, version 14, 2011) to determine the relationship between the analyzed parameters.

4. Conclusions

The results showed that the seasonal variation in 12 months did not affect the average yield of the essential oil of *L. organoides*, and also has little influence on its composition and antimicrobial potential. Thus, the information gathered during the course of this study extends the knowledge of this species with significant medicinal potential, furnishing scientific data that can be of great interest to the phyto-pharmaceutical industry in the future.

Acknowledgments

The authors are grateful for CNPQ/Bionorte, CAPES/Pró-Amazônia, CAPES/PVE and FAPESPA/PA for their financial support.

Author Contributions

SLFS, RHVM designed research; SLFS, RHVM, LAS, APFA, RBO, VYPC, RS, EES, JGSM performed research and analyzed the data; SLFS, RHVM, RBO, JGSM wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Pascual, M.E.; Slowing, K.; Carretero, E.; Mata, D.S.; Villar, A. *Lippia*: Traditional uses, chemistry and pharmacology: A review. *J. Ethnopharmacol.* **2001**, *76*, 201–214.
2. Santos, F.J.B.; Lopes, J.A.D.; Cito, A.M.G.L.; Oliveira, E.H.; Lima, S.G.; Reis, F.A.M. Composition and biological activity of essential oil from *Lippia origanoides* HBK. *J. Essent. Oil Res.* **2004**, *16*, 504–506.
3. Oliveira, D.R.; Leitão, G.G.; Bizzo, H.R.; Lopes, D.; Alviano, D.S.; Alviano, C.S.; Leitão, S.G. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K. *Food Chem.* **2007**, *101*, 236–240.
4. Viljoen, A.; van Vuuren, S.; Ernst, E.; Klepser, M.; Demirci, B.; Başer, H.; van Wyk, B.-E. *Osmitopsis asteriscoides* (Asteraceae)—The antimicrobial activity and essential oil composition of a Cape-Dutch remedy. *J. Ethnopharmacol.* **2003**, *88*, 137–143.
5. Andrade, E.H.A.; Alves, C.N.; Guimarães, E.F.; Carreira, L.M.M.; Maia, J.G.S. Variability in essential oil composition of *Piper dilatatum* L.C. Rich. *Biochem. Syst. Ecol.* **2011**, *39*, 669–675.
6. Hussain, A.I.; Anwar, F.; Nigam, P.S.; Ashraf, M.; Gilani, A.H. Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four *Mentha* species. *J. Sci. Food Agric.* **2010**, *90*, 1827–1836.
7. Stashenko, E.E.; Martínez, J.R.; Ruíz, C.A.; Arias, G.; Durán, C.; Salgar, W.; Cala, M. *Lippia origanoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. *J. Sep. Sci.* **2010**, *33*, 93–103.
8. Rojas, J.; Morales, A.; Pascuale, S.; Márquez, A.; Rondon, R.; Mathé, I.; Verés, K. Comparative study of the chemical composition of the essential oil of *Lippia oreganoides* collected in two different seasons of the year in Venezuela. *Nat. Prod. Commun.* **2006**, *1*, 205–207.
9. Silva, N.A.; da Silva, J.K.R.; Andrade, E.H.A.; Carreira, L.M.M.; Sousa, P.J.C.; Maia, J.G.S. Essential oil composition and antioxidant capacity of *Lippia schomburgkiana*. *Nat. Prod. Commun.* **2009**, *4*, 1281–1286.
10. Ribeiro, A.F.; Andrade, E.H.A.; Salimena, F.R.G.; Maia, J.G.S. Circadian and seasonal study of the cinnamate chemotype from *Lippia origanoides* Kunth. *Biochem. Syst. Ecol.* **2014**, *55*, 249–259.
11. Velasco J.; Rojas, J.; Salazar, P.; Rodríguez, M.; Díaz, T.; Morales, A.; Rondón, M. Antibacterial activity of the essential oil of *Lippia oreganoides* against multiresistant bacterial strains of nosocomial origin. *Nat. Prod. Commun.* **2007**, *2*, 85–88.

12. Tangarife-Castaño, V.; Correa-Royero, J.; Zapata-Londoño, B.; Durán, C.; Stashenko, E.E.; Mesa-Arango, A.C. Anti-*Candida albicans* activity, cytotoxicity and interaction with antifungal drugs of essential oils and extracts from aromatic and medicinal plants. *Infectio* **2011**, *15*, 160–167.
13. Betancur-Galvis, L.; Zapata, B.; Baena, A.; Bueno, J.; Ruíz-Nova, C.A.; Stashenko, E.E.; Mesa-Arango, A.C. Antifungal, cytotoxic and chemical analyses of essential oils of *Lippia organoides* H.B.K grown in Colombia. *Salud UIS* **2011**, *43*, 141–148.
14. Pinto, C.P.; Rodrigues, V.D.; Pinto, F.P.; Pinto, R.P.; Uetanabaro, A.P.T.; Pinheiro, C.S.R.; Gadea, S.F.M.; Silva, T.R.S.; Lucchese, A.M. Antimicrobial activity of *Lippia* species from the Brazilian semiarid region traditionally used as antiseptic and anti-infective agents. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* **2013**, doi:10.1155/2013/6145015.
15. Nerio, L.S.; Olivero-Verbel, J.; Stashenko, E.E. Repellent activity of essential oils from seven aromatic plants grown in Colombia against *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera). *J. Stored Prod. Res.* **2009**, *45*, 212–214.
16. Caballero-Gallardo, K.; Olivero-Verbel, J.; Stashenko, E.E. Repellency and toxicity of essential oils from *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon flexuosus* and *Lippia organoides* cultivated in Colombia against *Tribolium castaneum*. *J. Stored Prod. Res.* **2012**, *50*, 62–65.
17. Meneses, R.; Ocazonez, R.E.; Martínez, J.R.; Stashenko, E.E. Inhibitory effect of essential oils obtained from plants grown in Colombia on yellow fever virus replication *in vitro*. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **2009**, *8*, 6–8.
18. Escobar, P.; Leal, M.S.; Herrera, L.V.; Martinez, J.R.; Stashenko, E.E. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp essential oils and their major components. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2010**, *105*, 184–190.
19. Borges, A.R.; Aires, J.R.A.; Higino, T.M.M.; Medeiros, M.G.F.; Citó, A.M.G.L.; Lopes, J.A.D.; Figueiredo, R.C.B.Q. Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil. *Exp. Parasitol.* **2012**, *132*, 123–128.
20. Vicuña, G.C.; Stashenko, E.E.; Fuentes, J.L. Chemical composition of the *Lippia organoides* essential oils and their antigenotoxicity against bleomycin-induced DNA damage. *Fitoterapia* **2010**, *81*, 342–349.
21. Teles, S.; Pereira, J.A.; de Oliveira, L.M.; Malheiro, R.; Lucchese, A.M.; Silva, F. *Lippia organoides* H.B.K. essential oil production, composition, and antioxidant activity under organic and mineral fertilization: Effect of harvest moment. *Ind. Crops Prod.* **2014**, *60*, 217–225.
22. Castelo, A.V.M.; Del Menezzi, C.H.S.; Resck, I.S. Seasonal variation in the yield and the chemical composition of essential oils from two Brazilian native arbustive species. *J. Appl. Sci.* **2012**, *12*, 753–760.
23. NIST (National Institute of Standards and Technology). *Mass Spectral Library (NIST/EPA/NIH, v. 2.0d)*; The NIST Mass Spectrometry Data Center: Gaithersburg, MD, USA, 2005.
24. Adams, R.P. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, 4th ed.; Allured Publ. Corp.: Carol Stream, IL, USA, 2007.
25. Chorianopoulos, N.; Evergetis, E.; Mallouchos, A.; Kalpoutzakis, E.; Nychas, G.J.; Haroutounian, S.A. Characterization of the essential oil volatiles of *Satureja thymbra* and *Satureja parnassica*: Influence of harvesting time and antimicrobial activity. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 3139–3145.

26. Jerković, I.; Mastelić, J.; Miloš, M. The impact of both the season of collection and drying on the volatile constituents of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* grown wild in Croatia. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2001**, *36*, 649–654.
27. Sangwan, N.S.; Farooqi, A.H.A.; Shabih, F.; Sangwan, R.S. Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regul.* **2001**, *34*, 3–21.
28. Terblanché, F.C.; Kornelius, G. Essential oil constituents of the genus *Lippia* (Verbenaceae)—A literature review. *J. Essent. Oil Res.* **1996**, *8*, 471–485.
29. Matos, F.J.A.; Machado, M.I.L.; Craveiro, A.A.; Alencar, J.W. Essential oil composition of two chemotypes of *Lippia alba* grown in Northeast Brazil. *J. Essent. Oil Res.* **1996**, *8*, 695–698.
30. Zoghbi, M.G.B.; Andrade, E.H.A.; Santos, A.S.; Silva, M.H.L.; Maia, J.G.S. Essential oils of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. growing wild in the Brazilian Amazon. *Flavour Fragr. J.* **1998**, *13*, 47–48.
31. Zoghbi, M.G.B.; Andrade, E.H.A.; Silva, M.H.L.; Maia, J.G.S. Volatile constituents of *Lippia lupulina* Cham. *Flavour Fragr. J.* **2001**, *17*, 29–31.
32. Maia, J.G.S.; Taveira, F.S.N.; Andrade, E.H.A.; Silva, M.H.L.; Zoghbi, M.G.B. Essential oils of *Lippia grandis* Schau. *Flavour Fragr. J.* **2003**, *18*, 417–420.
33. Sarrazin, S.L.F.; Oliveira, R.B.; Barata, L.E.S.; Mourão, R.H.V. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Lippia grandis* Schauer (Verbenaceae) from the western Amazon. *Food Chem.* **2012**, *134*, 1474–1478.
34. Maia, J.G.S.; Silva, M.H.L.; Andrade, E.H.A.; Carreira, L.M.M. Essential oil variation in *Lippia glandulosa* Schauer. *J. Essent. Oil Res.* **2005**, *17*, 676–680.
35. Celiktaş, O.Y.; Kocabas, E.E.H.; Bedir, E.; Sukan, F.V.; Ozek, T.; Baser, K.H.C. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chem.* **2007**, *100*, 553–559.
36. Nostro, A.; Blanco, A.R.; Cannatelli, M.A.; Enea, V.; Flamini, G.; Morelli, I.; Roccaro, A.S.; Alonzo, V. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. *FEMS Microbiol. Lett.* **2004**, *230*, 191–195.
37. Ultee, A.; Bennik, M.H.J.; Moezelaar, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 1561–1568.
38. Ben Arja, A.; Combes, S.; Preziosi-Belloy, L.; Gontard, N.; Chalier, P. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Lett. Appl. Microbiol.* **2006**, *43*, 149–154.
39. Van den Dool, H.; Kratz, P.D.J.A. Generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J. Chromatogr. A* **1963**, *11*, 463–471.
40. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Approved Standard Eighth Edition*; NCCLS: Wayne, PA, USA, 2003.

Sample Availability: Sample of *Lippia origanoides* essential oil is available from the authors.