UNIVERSIDADE DE SOROCABA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA, EXTENSÃO E INOVAÇÃO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Renato dos Santos Henriques

AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE E TOXICIDADE DE DIFERENTES ÓLEOS ESSENCIAIS VISANDO UTILIZAÇÃO NA NANOTECNOLOGIA

Sorocaba-SP
2024

Renato dos Santos Henriques

AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE E TOXICIDADE DE DIFERENTES ÓLEOS ESSENCIAIS VISANDO UTILIZAÇÃO NA NANOTECNOLOGIA

Dissertação apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas**.**

Orientador: Prof.ª. Dra. Renata Lima

Sorocaba-SP
2024

Ficha Catalográfica

Henriques, Renato dos Santos
H449a Avaliação de atividade e toxicidade de diferentes óleos essenciais visando utilização na nanotecnologia / Renato dos Santos Henriques. – 2024.
48 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Renata de Lima.
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de Sorocaba, Sorocaba, SP, 2024.

1. Drogas - Resistência em microorganismos. 2. Medicamentos – Formas farmacêuticas. 3. Nanotecnologia. 4. Essências e óleos essenciais. I. Lima, Renata de, orient. II. Universidade de Sorocaba. III. Título.

Elaborada por Maria Carla P. F. Gonçalves – CRB-8/6721

Renato Dos Santos Henriques

AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE E TOXICIDADE DE DIFERENTES ÓLEOS ESSENCIAIS VISANDO UTILIZAÇÃO NA NANOTECNOLOGIA

Dissertação apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado: APROVADO

BANCA EXAMINADORA

gov.br Documento assinado digitalmente
RENATA DE LIMA
Data: 14/05/2024 17:22:32-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. Renata de Lima

Universidade de Sorocaba

gov.br Documento assinado digitalmente
DANIELE RIBEIRO DE ARAUJO
Data: 14/05/2024 15:51:49-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof (a). Dr (a). 1º examinador Danielle Ribeiro Araújo

Universidade Federal do ABC (UFABC)

gov.br Documento assinado digitalmente
ISALTINO PEREIRA DE ANDRADE JUNIOR
Data: 12/05/2024 21:38:41-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof (a). Dr (a). 2º examinador Isaltino Pereira de Andrade Junior

Universidade de Sorocaba

RESUMO

Com o advento dos antibióticos, a expectativa de vida dos seres vivos aumentou significativamente, porém a utilização descontrolada e abusiva levou à seleção de bactérias resistentes, sendo hoje este um dos maiores problemas enfrentados na saúde. O desenvolvimento de novos antimicrobianos não está acompanhando a resistência apresentada ao longo dos anos, e como consequência, temos cada vez mais cepas multidrogas resistentes. A resistência bacteriana não depende da cultura e nível social, países ricos como Estados Unidos da América (EUA) ou países desenvolvidos da Europa, assim como países em desenvolvimento, como o Brasil, são acometidos pelo mesmo problema. Devido a isto, novos estudos são realizados na tentativa de amenizar este problema, entre os vários temas estudados temos a utilização de óleos essenciais (O.E.), que tem ocupado um espaço importante na área. Alguns óleos essenciais como o de orégano, óleo essencial de tomilho e óleo essencial de frutas cítricas são utilizados na tentativa de auxiliar tratamentos e eliminar bactérias resistentes, os resultados apresentados são consequência da rica composição molecular de cada óleo. Porém maiores estudos são necessários para que este potencial seja comprovado cientificamente, assim como, a sua melhor forma para aplicação. Outra opção é o seu estudo aliado a novas tecnologias, como por exemplo a nanotecnologia ou a combinação com antibióticos já existentes. Este estudo realizou a avaliação de 5 óleos essenciais (orégano, cravo, canela, melaleuca e capim limão) em relação ao seu potencial antimicrobiano. Para isto, foram realizadas análises *in vitro* utilizando bactérias e fungos, assim como algumas cepas multidrogas resistentes. O teste realizado para avaliar a atividade bactericida foi o teste de disco difusão em ágar, para avaliação da cito e genotoxicidade foram realizados testes de difusão em ágar utilizando culturas celulares. Como resultado os óleos essenciais de orégano, canela e cravo mostraram alta atividade, porém o comportamento na exposição de diferentes bactérias apresentou diferentes resultados, mostrando que cada óleo possui melhor atividade a determinado microrganismo. Os resultados também mostraram que a diluição realizada com os óleos ainda permitiu sua atividade. Em relação a citotoxicidade com células animais e genotoxicidade em raízes de *Allium cepa* os óleos essenciais mostraram ser seguros, e não apresentaram números relevante de morte celular ou aberrações genéticas.

Palavras-chave: teste *in vitro*; bactérias multidroga resistentes; óleo essencial de orégano; óleo essencial de canela.

ABSTRACT

With the advent of antibiotics, the life expectancy of living beings has increased significantly. However, uncontrolled and abusive use has led to the selection of resistant bacteria, which is now one of the biggest problems faced in healthcare. The development of new antimicrobials has not kept pace with the resistance that has emerged over the years, and as a result, we have more and more multidrug-resistant strains. Bacterial resistance is not dependent on culture or social level; rich countries like the United States of America (USA) or developed countries in Europe, as well as developing countries like Brazil, are affected by the same problem. Due to this, new studies are being conducted in an attempt to mitigate this issue. Among the various topics studied is the use of essential oils (EO), which has occupied an important space in the field. Some essential oils, such as oregano oil, thyme essential oil, and citrus essential oil, are used to assist treatments and eliminate resistant bacteria. The results presented are a consequence of the rich molecular composition of each oil. However, more studies are needed to scientifically prove this potential, as well as to determine the best application methods. Another option is studying their use alongside new technologies, such as nanotechnology or combining them with existing antibiotics. This study evaluated the antimicrobial potential of 5 essential oils (oregano, clove, cinnamon, tea tree, and lemongrass). To do this, in vitro analyses were conducted using bacteria and fungi, as well as some multidrug-resistant strains. The test performed to evaluate bactericidal activity was the agar disk diffusion test, and for cytotoxicity and genotoxicity evaluations, agar diffusion tests were conducted using cell cultures. As a result, the essential oils of oregano, cinnamon, and clove showed high activity, but the behavior of different bacteria exposure presented varied results, indicating that each oil has better activity against a specific microorganism. The results also showed that dilution with the oils still allowed their activity. Regarding cytotoxicity with animal cells and genotoxicity in Allium cepa roots, the essential oils were found to be safe and did not present significant numbers of cell death or genetic aberrations.

Keywords: in vitro test; multidrug-resistant bacteria; oregano essential oil; cinnamon essential oil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 *– Cromatografia obtida das análises dos óleos essenciais. Os gráficos mostram composição dos óleos de cravo (Syzygium aromaticum), capim limão (Cymbopogon citratus), melaleuca (Melaleuca alternifolia), (D) canela (Cinnamomum cassia) e orégano (Origanum vulgare).* _____ *15*

Figura 2 *- Fórmula estrutural dos princípios ativos de cada óleo essencial. Fórmula estrutural do eugenol (cravo), geranial, neral (capim-limão), carvacrol (oregano), terpinen-4-ol (melaleuca) e trans-cinamaldeido (canela).* _____ *15*

Figura 3 – *Resultados dos testes de disco-difusão em ágar. (EC) Escherichia coli (PA) Pseudomonas aeruginosa (SA) Staphylococcus aureus (CA) Candida albicans.* _____ *21*

Figura 4 *– Resultados relativos das análises de diluição dos óleos realizadas por disco-difusão. O disco utilizado mede 6mm de diâmetro, sendo considerado 6mm quando não ocorreu o aparecimento de halo.* _____ *26*

Figura 5 – *Resultados dos testes de atividade em diferentes concentrações dos óleos essenciais em bateria multidrogas resistentes. As análises estatísticas consideram (a) para concentração 70%, (b) para concentração 50%, (c) para concentração 30% e (d) para concentração 10%. As cepas avaliadas foram Escherichia coli (3.20, amostra de sangue), Escherichia coli (3.5, amostra de urina), Pseudomonas aeruginosa (7.8, amostra urina) e Pseudomonas aeruginosa (7.12, amostra de secreção traqueal).* _____ *28*

Figura 6 – *Resultados das curvas cineticas de crescimento bacteriano com a utilização das concentrações inibitórias mínimas*_____ *32*

Figura 7 *– Resultados das análises de disco-difusão realizados com linhagens celulares HaCat e 3T3.* _____ *34*

Figura 8 *Resultados das análises de Allium cepa realizadas com os óleos essenciais puros. As letras a, indicam comparação estatística entre os resultados de índice mitótico dos O.E. As letras b, indicam a comparação estatística dos resultados dos índices de alteração apresentados em exposição aos O.E.* _____ *37*

LISTA DE QUADROS

*Quadro 1 – Características das bactérias resistentes utilizadas neste estudo, indicando o material de coleta, a espécies e a sensibilidade correspondente*_____*15*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - A análise dos resultados obtidos com a exposição dos óleos essenciais de cravo, melaleuca, capim limão, canela e orégano em exposição aos microrganismos ATT (Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa e Candida albicans e organismos multidroga resistentes). _____19

Tabela 2 – Resultado das análises de concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima, nos testes realizados com as bactérias multidrogas resistentes. _____23

LISTA DE ABREVIATURAS

EUA	Estados Unidos da América.
ATCC	*American Type Culture Collection*
MIC	Concentração Inibitória Mínima
CBM	Concentração Bactericida Mínima
PIP/Tazo	Piperacilina Sódica + Tazobactam Sódico
O/A	Proporção Óleo E Água

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 8

1.1 ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO 11
1.2 ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO 11
1.3 OLÉO ESSENCIAL DE CANELA 11
1.4 ÓLEO ESSENCIAL DE MELALEUCA 12
1.5 ÓLEO ESSENCIAL DE CAPIM LIMÃO 13

2 JUSTIFICATIVA 13

3 OBJETIVOS 14

3.1 OBJETIVO GERAL 14
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 14

4 MATERIAL E MÉTODOS 14

4.1 MATERIAL 14
4.2 MÉTODO 17
4.2. ANÁLISE DE ATIVIDADE 17
4.2.1 TESTE DE DISCO-DIFUSÃO EM ÁGAR (POTENCIAL ANTIMICROBIANO) 17
4.2.2 ELABORAÇÃO DA EMULSÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS 17
4.2.3 TESTE DE DISCO-DIFUSÃO EM ÁGAR COM DILUIÇÃO MÍNIMA 17
4.2.4 CINÉTICA DE CRESCIMENTO BACTERIANO NA PRESENÇA DE ÓLEOS ESSENCIAIS 17
4.2.5 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (MIC) 18
4.2.6 CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (MBC) 18
4.3 AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE 18
4.3.1 ENSAIO DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICA EM RAÍZES DE ALLIUM CEPA 18
4.3.2 TESTE DISCO-DIFUSÃO EM CÉLULAS ANIMAIS 19
4.3.3 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR PELO TESTE DE EXCLUSÃO COM AZUL DE TRIPAN 20
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA 20

5 RESULTADOS 20

5.1 ANÁLISES DE ATIVIDADE BACTERIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS 20
5.2 ANÁLISE DE CITO E GENOTOXICIDADE 34
5.2.1 ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR 34
5.2.2 GENOTOXICIDADE EM ALLIUM CEPA 35

6 CONCLUSÃO 37

REFERÊNCIAS 38

1 INTRODUÇÃO

Bactérias multirresistentes são uma das maiores ameaças para a saúde pública atual e estão associadas ao aumento no tempo de internação, elevado custos no tratamento e altas taxas de morbimortalidade dos pacientes (BRASIL, 2021). Várias espécies bacterianas são capazes de disseminar-se no ambiente hospitalar. Importante destacar que a higienização inadequada dos leitos, uso de jaleco em ambientes impróprios, má assepsia das mãos e dos equipamentos e falta de treinamento periódico dos profissionais favorecem a disseminação bacteriana (JACOBY, 2008). Isto faz com que exista uma constante procura de novos fármacos ou novas formas de combate (LIMA *et al*., 2019).

Todos os países apresentam grandes prejuízos devido à resistência bacteriana, nos Estados Unidos as bactérias multirresistentes geram um prejuízo de mais de R$ 4 bilhões, e quase 90 mil mortes/ano (BRITO, 2010). O uso de antimicrobianos em altas dosagens são a principal causa de resistência de bactérias, de acordo com Laxminarayan *et al*. (2013) a Europa e Estados Unidos apresentam níveis mais altos de uso de antibióticos do que o Brasil, mesmo assim estes apresentam problemas semelhantes em relação a resistência bacteriana. O saneamento básico também influencia nos números de resistência bacteriana, uma vez que, a falta de saneamento básico aumenta os números de doenças com as bactérias fecais (BARTLEY *et al*., 2019)

McGowan Junior (1983) relatou que os principais fatores que favorecem o desenvolvimento de resistência bacteriana é a presença do antibiótico, relatado desde a década de 80, que pode levar a um desequilíbrio da flora bacteriana do paciente, favorecendo a proliferação de microrganismos oportunistas, contribuindo para o surgimento de novas infecções. como muitos antibióticos são quimicamente relacionados, quando um microrganismo desenvolve resistência a um medicamento, também acaba desenvolvendo a toda classe relacionada (GUARDABASSI *et al*., 2018; GUARDABASSI E PRESCOTT, 2015). O desenvolvimento da resistência pode ser através de mutações cromossômicas ou bactérias transferirem os genes de resistência entre elas. A forma mais comum e eficiente pela qual as bactérias adquirem resistência é por meio de mutações cromossômicas, que as capacitam a produzir enzimas que neutralizam a ação dos antibióticos (DE FREITAS SOUZA, 2022). A transferência de informação genética entre bactérias pode ser classificada em três categorias principais: conjugação, transformação e transdução. A conjugação, sendo a mais complexa, envolve a recombinação cromossômica entre células, resultando em novas combinações genéticas que são transmitidas às células-filhas durante a divisão celular subsequente (MUNITA; ARIAS, 2016). A transformação ocorre quando uma bactéria incorpora um gene de

resistência presente no ambiente, enquanto a transdução envolve a transferência de genes de resistência mediada por bacteriófagos (THOMAS; NIELSEN, 2005).

O período necessário para a ocorrência desse fenômeno mostrou-se surpreendentemente curto para muitos fármacos, enfatizando a imensa capacidade de adaptação dos micro-organismos a ambientes hostis, artificialmente criados pelo homem (PATERSON; BONOMO, 2005). Alguns estudos mostram que após o aparecimento e utilização dos antibióticos já foram identificadas milhares de bactérias resistentes e este número cresce constantemente. Embora novos fármacos sejam desenvolvidos, estes não acompanham o ritmo da resistência alcançada pelas bactérias, sendo que estas adquirem resistência a novos fármacos constantemente (BASSETI *et al*., 2013; VENTOLA, 2015; CANIAUX *et al*., 2017; KASSIROV *et al*., 2018). Na tentativa de amenizar este problema inúmeros estudos avaliam a utilização de métodos alternativos como a utilização de bacteriófagos, nanopartículas e os Crisprs (LIMA *et al*. 2019).

A utilização de óleos essenciais também aparece como uma alternativa a ser considerada, pois estes são utilizados há milhares de anos na medicina popular ao longo da história (VENTOLA, 2015). A composição de um óleo essencial pode variar significativamente entre produtores como também devido a origem, condições do solo, clima e modo de produção. Contudo, podem ser identificadas até 400 substâncias que lhes atribuem características como aromas e sabores específicos, além de atividades terapêuticas, tais como antioxidante, anti-inflamatória e analgésica (PANDINI *et al*., 2017). Embora eles apresentem alta volatilidade, muitos estudos mostram que possa existir um grande potencial bacteriano nestes compostos, principalmente os que são ricos em fenóis, álcoois e aldeídos aromáticos (CECOTTI *et al*., 2016). Além disto, é possível se fazer combinações entre os diferentes óleos e entre óleos e antibióticos já existentes, devido a possível sinergia entre os diferentes elementos possibilitando ação em múltiplos alvos (LANGEVELD *et al*., 2014).

Simões (1999) mostrou que os óleos essenciais são complexas misturas de substâncias voláteis, geralmente lipofílicas, cujos componentes incluem hidrocarbonetos, álcoois simples, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, ácidos orgânicos fixos. Brochot *et al*. (2017) mostraram que misturas de diferentes óleos essenciais de *C. zeylanicum, D. carota, E. globulus e R. officinalis* foram altamente eficazes no combate de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e vírus. Mais recentemente Donato *et al*. (2020) obtiveram resultados que indicam perspectivas para a aplicação clínica de óleos essenciais contra espécies de Malassezia.

Entre os diferentes óleos essenciais com possível ação antimicrobiana e bactericidas, os ricos em álcoois terpênicos ($C_{10}H_{15}OH$), fenóis ($C_{10}H_{14}O$) e aldeídos aromáticos são os mais

cotados para tratamentos antimicrobianos, entre estes temos os óleos essenciais de orégano (contendo Carvacrol, Linalol, Timol, Parcimeno, Gama-terpineno), óleo essencial de melaleuca (contendo Terpinen4-ol), óleo essencial de canela (contendo cinamaldeido) (RADÜNZ *et al*., 2019; SIM *et al*., 2019; TARIQ *et al*., 2019; MONZOTE *et al*., 2020).

Outro estudo realizado por Chaturvedi *et al*. (2021), onde foi avaliado a composição química e a atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas senescentes de goiaba (*P. guajava*). Como principais componentes foram identificados aldeído terpênico, óxido terpênico (limoneno, (E)-cariofileno e óxido de cariofileno). O óleo mostrou inibição significativa de bactérias patogênicas humanas (CIM: 0,065–0,261 mg/mL) e fungos fitopatogênicos, a saber, *C. luneta* (86,02%) e *Fusarium chlamydosporum* (82,80%).

A ação bactericida de óleos cítricos também foi observada (GERACI *et al*., 2017; DENG *et al*., 2020; YOUCEF-ETTOUMI *et al*., 2020; DENKOVA-KOSTOVA *et al*., 2021; SIMONA *et al*., 2021). O óleo essencial de capim-limão, composto de praticamente ≈70% de citral, foi altamente eficaz para erradicar os biofilmes de duas espécies, impedindo as interações entre *Candida albicans e Staphylococcus aureus*. O tratamento realizado com citral suprimiu as adesinas hifais e os fatores virulentos em *Candida albicans*, também foi observado uma queda da expressão dos genes envolvidos no *quorum sensing*, peptidoglicano e biossíntese de ácidos graxos em *Staphylococcus aureus* (GAO *et al*., 2020).

Os terpenos são uma classe de moléculas aonde foram até o momento catalogados mais de 200 terpenos, sendo obtidos de diferentes partes das plantas. Entre esses compostos, os diterpenóides são os terpenos mais dominantes relatados (YAO *et al*, 2016). As estruturas dos terpenóides contêm uma ou mais unidades de isopreno e diferem na ocorrência de ligações duplas, carbonila, carboxila, ceto e grupos hidroxila, as estruturas alifáticas são chamadas de terpenos, enquanto as estruturas com grupos funcionais são chamadas de terpenoides, ambas as estruturas de terpeno e terpenóide foram detectadas como metabólitos secundários em plantas (BREITMAIER, 2006), e são divididos em monoterpenoides, sesquiterpenoides, diterpenoides e triterpenoides (WU *et al*, 2016). Esses terpenos têm como função principal dar cor e odor ao vegetal que ela se encontra (SOMMER et al, 2022).

A literatura ainda não apresenta um consenso sobre o mecanismo de ação dos óleos essenciais 100% descobertos, porém acredita-se que a maioria deles exerce efeito antimicrobiano na estrutura da parede celular bacteriana, desnaturando e coagulando proteínas, as alterações da permeabilidade da membrana citoplasmática para íons de hidrogênio e potássio,

causando a interrupção dos processos vitais da célula, como transporte de elétrons, translocação de proteínas, fosforilação e outras reações que dependem de enzimas, o que resulta em perda do controle osmótico da célula , levando à morte bacteriana (DORMAN ; DEANS, 2000).

1.1 Óleo essencial de orégano

A escolha dos óleos essenciais foi baseada em estudos publicados na literatura. O orégano (*Origanum vulgare*) é uma erva perene e aromática, muito utilizada na cozinha do Mediterrâneo, são utilizadas as suas folhas, frescas ou secas, pelo sabor e aroma que dão aos pratos. Esta planta tem sido usada para doenças estomacais e respiratórias. As principais atividades medicinais do orégano são antibacterianas e atividades antioxidantes (PRIETO *et al*., 2007; VUJICIC *et al*., 2015; HAN e PARKER, 2017). O óleo essencial de orégano foi escolhido baseado em estudos de Rhayour *et al*. (2003), Nazer *et al*. (2005), e Silva *et al*. (2005), estes mostraram uma composição contendo carvacrol e timol, os quais apresentam efeito inibitório *in vitro* da multiplicação de *Salmonella enterica*. Contudo sua atividade bacteriana pode variar de acordo com a concentração do carvacrol e do timol, essas variações depende de vários fatores, como o clima, o solo, o método de extração do óleo essencial (COSENTINO *et al*., 1999; JULIANO; MATTANA; USAI, 2000; FALEIRO *et al*., 2002; FALCONE *et al*., 2005; OUSSALAH *et al*., 2006).

1.2 Óleo essencial de cravo

O cravo, da família Myrtaceae, originária da Malásia, sempre foi valorizado no mercado das especiarias. A principal utilização do cravo é como especiaria, na culinária ou na indústria alimentícia com aromatizante de molhos e outros produtos. Um subproduto do cravo, de grande importância no mercado é o óleo essencial, sendo o eugenol como principal componente, muito valorizado na indústria farmacêutica e perfumaria (MENDES FERRÃO, 1993). Devido a isso o óleo essencial de cravo foi selecionado por apresentar na sua composição 3 moléculas principais, o eugenol (83,75%) o β-cariofileno (≈10,98%) e o α-humuleno (≈1,26%), sua ação antioxidante e antimicrobiana são atribuídas ao eugenol devido ter sua concentração ser alta (PATTNAIK *et al*., 1997; VAN ZYL *et al*., 2006). Diversas atividades farmacológicas foram observadas para esse composto como por exemplo: inibidor da formação de edema, anti-inflamatório, antitumoral, bactericida, insetífugo e antialérgico (SHIMIZU *et al*. 1990).

1.3 Oléo essencial de Canela

A canela, espécie da família Lauraceae é essencialmente utilizada como especiaria, na indústria de doces, na composição dos aromatizantes para bebidas e na produção de incenso.

Na medicina tradicional é estimulante, eupéptica, carminativa e antidiarréica. O óleo essencial da canela é de alta qualidade e bastante valorizado. O rendimento de óleo da casca está em torno de 2%, e das folhas 1%. A composição do óleo essencial é muito variável, de 60 a 90% de aldeído cinâmico e 10% de eugenol na casca e 10% de aldeído cinâmico e 60 a 95% de eugenol nas folhas (ALBUQUERQUE, 1989). Por esses motivos o óleo essencial de canela folha também foi selecionado para esse projeto por causa de seu principal composto o (E)-cinamaldeído, porém esta não é a única molécula encontrada, estando presentes também o į-cadineno Į-copaeno e Į-amorfeno, porém menos de 1% cada um (SINGH *et al*., 2007).

A utilização desse óleo é muito efetiva na inibição do crescimento bacteriano devido ao aldeído cinâmico estar em altas concentrações devido aos danos que ele provoca aos lipídios e proteínas das bactérias e impedindo a ação das aminoácido decarboxilases (BURT, 2004). Ouattara *et al*. (1997), mostrou que o óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* tem efeito inibidor da deterioração de alimentos por microrganismos. Montes-Belmont e Carvajal (1998), ao misturar o óleo essencial de canela com sementes de milho contra A. flavus, observaram inibição no crescimento do fungo. O cinamaldeído (C_9H_8O) é composto por um anel benzênico, uma ligação dupla insaturada e um grupo aldeído, apresentando alta reatividade de oxidação (CHEN et al, 2011), é o principal componente do óleo essencial de canela, que é extraído por destilação a vapor (VIAZIS et al, 2011).

1.4 Óleo essencial de Melaleuca

Outro óleo selecionado para este trabalho foi o óleo essencial de melaleuca. O óleo essencial de melaleuca é extraído da *Melaleuca alternifolia* e é extremamente volátil, esta árvore também chamada de “Tea tree”, cuja principal molécula encontrada é o Teatreeoil (SHARIFI-RAD *et al*; 2017). Este óleo apresenta cor amarela, de odor característico extraído do vapor das folhas e ramos terminais da planta. É composto de hidrocarbonetos terpenos principalmente monoterpenos e sesquiterpenos (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006), que são hidrocarbonetos aromáticos voláteis e podem ser considerados polímeros do isopreno (CORREIA *et al*., 2017; MERTAS *et al*., 2015). Sua principal ação é a antifúngica e antibacteriana, é devido principalmente ao Teatreeoil. De Groot e Schmidt (2016), relataram que esse óleo apresenta ação antiacne, onicomicoses, dermatites, eczema, dor de dente e contra halitose.

1.5 Óleo essencial de Capim limão

O óleo essencial de capim limão (*Cymbopogon citratus)*, pertencente à família Poaceae, é originária da Índia e largamente distribuída por vários países tropicais. No Brasil assume diferentes sinonímias como capim-limão, capim-santo, erva-cidreira entre outras. Estudos sugerem que a atividade antibacteriana do capim-limão reside principalmente nos componentes α- e β-citral presentes no óleo (ONAWUNMI; YISAK; OGUNLANA, 1984). O óleo essencial de capim limão na indústria farmacêutica é utilizado na síntese de importantes compostos como iononas, metil-iononas e vitamina A. Sua composição constitui os monoterpenos citral (mistura isomérica de neral e geranial) e o mirceno (PRINS *et al*., 2008). Costa *et al*. (2009), mostraram que os componentes majoritários α e β-citral são os principais responsáveis pela atividade antimicrobiana e antifúngica. Já Lorenzi (2000), mostrou que o chá do capim-limão é usado para alívio de pequenas crises de cólicas uterinas e intestinais, bem como no tratamento do nervosismo e estados de intranquilidade.

Desta maneira, embora existam estudos que mostrem a eficiência dos óleos essenciais, ainda se faz necessário uma maior abordagem na tentativa da sua aplicação no combate às bactérias multidroga resistentes. Devido a isto, este projeto pretende avaliar a atividade antimicrobiana de alguns óleos essenciais cotados para o combate de bactérias multidrogas resistentes, entre eles os óleos essenciais de orégano, cravo, canela, melaleuca e capim limão. Esta avaliação de atividade tem o objetivo de verificar os melhores óleos ou as melhores sinergias para combate a diferentes tipos de bactérias, visando futuramente sua aplicação aliada à nanotecnologia.

2 JUSTIFICATIVA

A literatura publicada sobre a atividade antimicrobiana de óleos essenciais deixa claro que os óleos essenciais apresentam propriedades antibacterianas, antifúngicas e antivirais únicas, sendo possível sua aplicação no combate a bactérias multidrogas resistentes. Estes são considerados produtos químicos de grau *GRAS* (geralmente considerados seguros) pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA, não existindo problemas de toxicidade associados a eles. Logo este projeto se justifica pela necessidade de um estudo mais abrangente em relação tanto a atividade, como toxicidade dos óleos essenciais, onde foi avaliada tanto sua atividade isolada como a atividade da sinergia composta com diferentes óleos visando aplicações futuras em estudos de desenvolvimento de nanopartículas para potencializar suas atividades. Logo estudos detalhados são bem-vindos para que esta atividade seja comprovada.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antimicrobiana e a toxicidade dos óleos essenciais de orégano, cravo, canela, melaleuca e capim limão visando aplicação futura na nanotecnologia.

3.2 Objetivos específicos

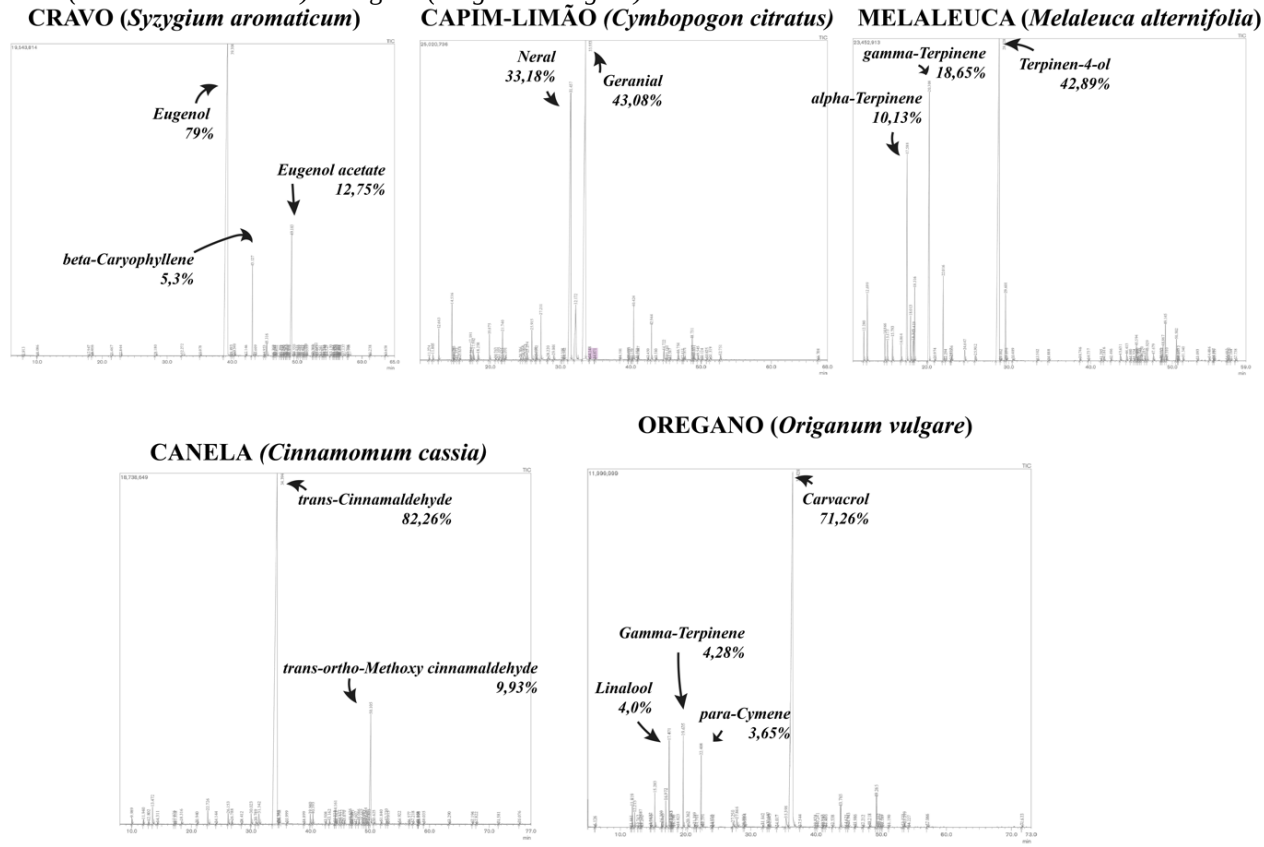
- Verificar a viabilidade celular utilizando teste de disco difusão com diferentes linhagens celulares.
- Avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade dos óleos escolhidos utilizando teste de *Allium cepa*
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais utilizando técnica de disco difusão em ágar tanto com organismos de linhagens comerciais (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*) como organismos multidroga resistentes de origem hospitalar.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

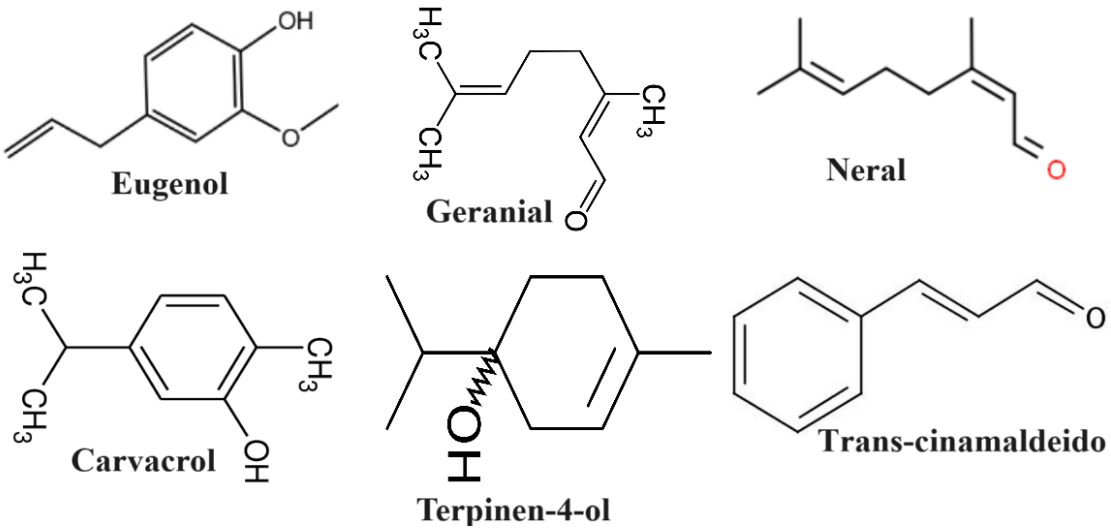
Os óleos essenciais de orégano, cravo, canela, melaleuca e capim limão, foram adquiridos pelo fornecedor doTERRA, onde é possível se obtém a análise cromatográfica do lote específico. Os links para as cromatografias dos óleos são mostrados abaixo (Figura 1). Juntamente com as fórmulas estruturais de seus princípios ativos (Figura 2).

Figura 1 – Cromatografia obtida das análises dos óleos essenciais. Os gráficos mostram composição dos óleos de cravo (*Syzygium aromaticum*), capim limão *(Cymbopogon citratus)*, melaleuca *(Melaleuca alternifolia)*, *(D)* canela *(Cinnamomum cassia) e* orégano *(Origanum vulgare).*



Fonte: baseada nas informações cedidas pela doTerra.
https://sourcetoyou.com/pt/quality-report?quality_id=3212160BR,
https://sourcetoyou.com/pt/quality-report?quality_id=2212241br,
https://sourcetoyou.com/pt/quality-report?quality_id=22114013BR,
https://sourcetoyou.com/pt/quality-report?quality_id=2211964BR,
https://sourcetoyou.com/pt/quality-report?quality_id=2220826BR

Figura 2 - *Fórmula estrutural dos princípios ativos de cada óleo essencial. Fórmula estrutural do eugenol (cravo), geranial, neral (capim-limão), carvacrol (oregano), terpinen-4-ol (melaleuca) e trans-cinamaldeido (canela).*



Fonte: COSTA, 2022; MOURA, 2022; DE CASTRO, 2010; MOTA, 2017.

Os microrganismos utilizados foram cepas *ATCC* 25923, 25922, 10145 e 10231, respectivamente de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* (fungo), as quais foram doadas pela CEFAR DIAGNOSTICA. Foram utilizadas também cepas multidrogas resistentes com laudos de testes realizados com microbiologia clássica com diferentes antimicrobianos, as cepas foram cedidas pelo laboratório TriAnálises, na cidade de Sorocaba (Quadro 1).

Quadro 2 – Características das bactérias resistentes utilizadas neste estudo, indicando o material de coleta, a espécies e a sensibilidade correspondente

Material	Microrganismo Isolado	Sensível	Resistente
3.5 Urina	*Escherichia coli*	Amoxacilina, Gentamicina, Imipenem, Ertapenen	Ácido Pipemidico, Ceftriaxona, Sulfazotrim, Aztreonan, Ácido Nalidixico, Ciprofloxacina, Cefotaxima, Cefalotina, Norfloxacin, Ampicilina.
3.20 Sangue	*Escherichia coli*	Amoxacilina, Aztreonan, Ceftriaxona, Cefuroxime, Cefalotina, Gentamicina, Meropenem, Imipenem, Ertapenen	Sulfazotrim, Ampicilina, Ciprofloxacina
7.8 Urina	*Pseudomona aeruginosa*	Aztreonan, Polimixina B	Ácido Nalidixico, Ácido Pipemidico, Ampicilina, Cefalotina, Ciprofloxacina, Sulfazotrim, Gentamicina, Ceftriaxona, Cefuroxima, Amoxicalina, Nitrofurantoina, Norfloxacim, Imipenem, Meropenem, Ertapenen
7.12 Secreção Traqueal	*Pseudomona aeruginosa*	Imipenen, Meropenem	Amicacina, Aztreonan, Cefepime, Cefotaxima, Ceftazidima, Ceftriaxona, Ciprofloxacina, Gentamicina, PIP/Tazo, Piperacillin, Tobramicina

FONTE: LABORATÓRIO TRIANÁLISES. **TABELA IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS COM RELAÇÃO À RESITÊNCIA.** Sorocaba 2023.

As linhagens celulares utilizadas neste trabalho, 3T3 (fibroblastos, de embrião de rato), HaCat (queratinócitos humanos) foram obtidas no Banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ).

4.2 Método

4.2. Análise de atividade

4.2.1 Teste de disco-difusão em ágar (potencial antimicrobiano)

Inicialmente o teste de disco-difusão em ágar foi realizado utilizando os microrganismos *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Candida albicans* (organismos ATCC). Para isto as placas com ágar nutriente foram inoculadas com caldo contendo os microrganismos na concentração de 2 x 10^8 UFC.mL^{-1} e em seguida foram adicionados discos de papel-filtro impregnados com os óleos essenciais. Para controle negativo e positivo discos impregnados com água (negativo) e com o antibiótico penicilina (positivo). O material foi incubado por 24 horas, a 37ºC, e após esse período os diâmetros dos halos de inibição dos microrganismos foram mensurados em milímetros. Após estas primeiras análises foram realizadas também avaliação da atividade antimicrobiana com as bactérias resistentes.

4.2.2 Elaboração da emulsão dos óleos essenciais

As emulsões foram feitas empregando os óleos essenciais (45% p/p), agua deionizada (45% p/p) e pectina (10% p/p) como emulsionante. Na fase aquosa solubilizou-se a pectina. O preparo da emulsão envolveu a seleção de proporções de óleo e água O/A (1/1,0.7/1,0.5/1,0.3/1,0.1/1), em seguida foram homogeneizadas por agitação mecânica a 10.000 rpm por 5 minutos em um vortex, A estabilidade ao longo do tempo foi monitorada armazenando em geladeira (temperatura 4°C) por até 6 meses.

4.2.3 Teste de disco-difusão em ágar com diluição mínima

O teste para a determinação do disco-difusão em ágar com diluição mínima para cada óleo essencial foi realizado com os microrganismos ATCC e com 4 cepas multidroga resistentes dos microrganismos, *Escherichia coli* (3.20, amostra de sangue), *Escherichia coli* (3.5, amostra de urina), *Pseudomonas aeruginosa* (7.8, amostra urina) e *Pseudomonas aeruginosa* (7.12, amostra de secreção traqueal). Os microrganismos foram cultivados em placas de *petri,* A exposição dos microrganismos foi realizada utilizando diferentes concentrações das amostras (100%, 70%, 50%, 30% e 10%), seguido de incubação a 37ºC por 24 horas. Após 24 horas os halos foram avaliados, sendo cada um deles medidos com uma régua milimétrica.

4.2.4 Cinética de crescimento bacteriano na presença de óleos essenciais

A avaliação da cinética de crescimento bacteriano foi realizada a partir de uma adaptação do protocolo descrito por Amin *et al*. (2009). Inicialmente foram inoculadas 1 x 10^5 UFC/mL

de bactérias em cada poço em uma placa de 96 poços de fundo plano. O monitoramento foi realizado por absorbância, via turbidez, que foi realizado a comprimento de onda de 600 nm. A concentração testada foi correspondente ao MIC de cada bactéria/óleo, e após início da exposição foram analisadas nos tempos 1, 6, 12 e 24h, mantendo as placas em uma temperatura de 35°C entre as leituras.

4.2.5 Concentração inibitória mínima (MIC)

O teste para a determinação da concentração inibitória mínima (MIC) de óleo essencial será realizado com os microrganismos Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Candida albicans e cepas multidroga resistentes. Os microrganismos serão previamente cultivados em caldo Mueller Hinton, adicionados em placas de 96 poços na concentração de 5 x 106 UFC.mL-1. Então, será realizada exposição dos microrganismos as amostras em concentrações decrescentes (35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5% e 1%), completando os poços com caldo para um volume final de 90 µL, seguido de incubação a 37ºC por 24 horas. Passadas as 24 horas serão adicionados 10 µL de solução de Resazurin (6,75 mg.mL-1) em cada poço e realizada incubação a 37ºC por 24 horas, para posterior análise visual da coloração dos poços.

4.2.6 Concentração bactericida mínima (MBC)

A análise de concentração bactericida mínima (MBC) será realizada a partir da análise MIC. Após a exposição e incubação dos microrganismos com as amostras em diferentes concentrações para a análise MIC, antes da adição da solução de Resazurin, serão coletados 10 µL das suspensões de cada microrganismo e realizada inoculação em ágar Muller Hilton, seguida de incubação por 24 horas a 37ºC. Após esse período será determinada a MBC, ou seja, em qual concentração de exposição a contagem bacteriana foi reduzida em pelo menos 99,9%.

4.3 Avaliação de citotoxicidade e genotoxicidade

4.3.1 Ensaio de aberrações cromossômica em raízes de Allium cepa

Sementes de *Allium cepa* foram colocadas para germinar e quando as raízes chegaram a 2 cm foram transferidas para tubos e expostas aos óleos essenciais pelo período de 24 h. Após este intervalo as raízes foram fixadas (Metanol:Ácido Acético – 3:1) e posteriormente submetidas a hipotonia ácida com HCl 1M. Após hipotonia as raízes foram coradas em reativo

de Schiff, seguido de montagem das lâminas pela técnica de esmagamento onde uma gota de Carmim Acético foi utilizada. Foram analisadas aproximadamente 500 células de cada lâmina.

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico com objetiva 20X, observando divisões celulares para calcular o Índice Mitótico (IM), bem como observar aberrações cromossômicas, como a presença de cromossomos retardatários, pontes, micronúcleos entre outras. Os resultados do *Allium cepa* foram utilizados para cálculos de Índice de Aberrações Cromossômicas (IA), Índice Mitótico Relativo (IMr) e Índice Relativo de Aberrações Cromossômicas (IAr), Equações 1, 2, 3 e 4.

$$IM = {}^{indice\ de\ divisão}/_{total\ de\ células} \qquad eq.1$$

$$IA = {}^{numero\ de\ danos}/_{numero\ de\ células\ em\ divisão} \qquad eq.2$$

$$IMr = {}^{IM\ da\ exposição}/_{IM\ do\ controle} \qquad eq.3$$

$$IAr = {}^{IA\ da\ exposição}/_{IA\ do\ controle} \qquad eq.4$$

4.3.2 Teste disco-difusão em células animais

Para a avaliação de viabilidade celular foi realizado o teste de disco difusão em ágar, isto foi necessário devido dificuldade de exposição dos óleos essenciais, pois estes não diluem em meio de cultura não entrando em contato com as células em testes comuns de viabilidade, como MTT.

Para realização do teste, volumes de 5mL de suspensão das linhagens celulares HaCat e 3T3 foram semeados separadamente em placas de Petri de 60mm, na concentração de 1,5 x10^5 células/mL em meio de cultura e incubadas durante 24h a 37ºC em estufa com ambiente de 5% de CO_2. Em seguida, o meio líquido foi descartado e o meio sólido foi adicionado sobre o tapete celular. No momento do uso, o ágar era fundido e misturado com o meio de cultura, ambos à temperatura de 44ºC e 5mL desta mistura era adicionado às placas de cultura.

Após o completo endurecimento do meio sólido foi colocado os discos de papel-filtro impregnados com os óleos essenciais puro no centro das placas e as placas foram incubadas a 37ºC em ambiente de 5% de CO_2, na posição invertida. As leituras das placas inoculadas foram feitas macroscopicamente, onde a presença da citotoxicidade era constatada pela presença do halo ao redor do material tóxico correspondente às células mortas. Quando presente, os

diâmetros dos halos resultantes do efeito citotóxico eram cuidadosamente medidos usando régua milimétrica.

4.3.3 Determinação da viabilidade celular pelo teste de exclusão com azul de tripan

Para a avaliação dos possíveis efeitos das amostras sobre a viabilidade celular será realizado o teste de exclusão com azul de tripan. As células serão expostas as amostras por 1 hora, em concentrações determinadas com base no resultado do ensaio MTT, e em seguida serão coradas com azul de tripan. Como controle positivo, as células serão expostas a uma solução de peróxido de hidrogênio 0,5 M de como controle negativo as células serão mantidas em meio de cultura livre de qualquer exposição. Será então realizada contagem em microscópio ótico, considerando inviáveis as células coradas de azul e viáveis as células que não apresentarem coloração, indicando que não ocorreu dano de membrana.

4.4 Análise estatística

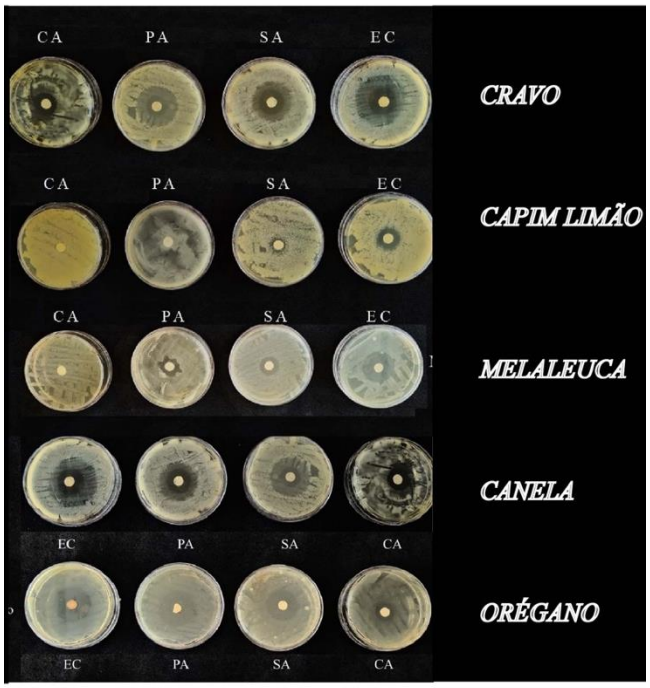
A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA, seguida do Tukey's HSD post hoc test (variâncias iguais), programa GraphPad Prism9. A significância estatística foi definida como $p<0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Análises de atividade bacteriana dos óleos essenciais

As análises de disco-difusão em ágar (Figura 3) com os óleos essenciais utilizando em exposição aos microrganismos ATCC mostraram que a *Escherichia coli* apresentou sensibilidade a todos os óleos testados, a *Staphylococcus aureus* teve muita sensibilidade com o óleo de melaleuca, orégano, canela e de cravo, porém não teve reação com a de capim limão, em relação a *Pseudomonas aeruginosa* foi possível observar sensibilidade aos óleos, sendo somente o óleo de Capim limão o que não apresentou atividade.

Figura 3 – *Resultados dos testes de disco-difusão em ágar. (EC) Escherichia coli (PA) Pseudomonas aeruginosa (SA) Staphylococcus aureus (CA) Candida albicans.*



Fonte: Imagem do autor.

Os resultados mostraram que a *Escherichia coli* foi sensível aos óleos essenciais de cravo, melaleuca, canela e orégano, a cepa *Staphylococcus aureus* apresentou sensibilidade aos óleos de cravo, canela e orégano, em relação ao óleo de Melaleuca o halo formado foi pequeno, sendo resistente ao óleo essencial de capim limão, já a cepa *Pseudomonas aeruginosa* e a *Candida albicans* não apresentaram sensibilidade aos óleos essenciais de capim limão e melaleuca.

Os resultados foram dimensionados e são apresentados juntamente com os resultados da exposição aos microrganismos multidroga resistentes (Tabela 1).

Tabela 3 - A análise dos resultados obtidos com a exposição dos óleos essenciais de cravo, melaleuca, capim limão, canela e orégano em exposição aos microrganismos ATT (Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa e Candida albicans e organismos multidroga resistentes).

Microrganismo	**Média relativa dos halos formadas pelos Óleos puros**					
	Canela	**Cravo**	**Orégano**	**Melaleuca**	**Capim Limão**	**Pen.**
Escherichia coli	9.66	9.33	8.33	5	2.5	8.33
Pseudomonas aeruginosa	8.33	8.5	8	1.83	1	8
Staphylococcus aureus	8.33	8.33	7.16	1.66	1.33	9
Candida albicans	4.16	3.33	2.33	1	1	10
***Escherichia coli* (3.20)**	8.33	5	9.16	6.66	1	5
***Escherichia coli* (3.5)**	8	5	10	5	1	2.5
***Pseudomonas aeruginosa* (7.8)**	8.33	4.16	10	5	1	4
***Pseudomonas aeruginosa* (7.12)**	10	10	10	4.16	1	4

FONTE: Elaboração própria

Os resultados apresentados mostram a boa atividade do óleo de canela e de cravo, Rieger e Schiffman (2014) em seus estudos obtiveram resultados semelhantes, indicando que o óleo essencial de canela apresenta atividade antimicrobiana de amplo espectro, isto provavelmente se dá devido a molécula de cinamaldeído presente neste óleo em grandes quantidades (82,26% de trans cinemaldeydo), e devido a presença de terpenóides, as quais são moléculas tóxicas para as membranas celulares de bactérias e fungos, embora no presente estudo, a atividade em relação ao fungo utilizado não tenha apresentado resultados tão significativos.

No estudo realizado por Zhang *et al*. (2022), observou-se que o tratamento com óleo essencial de canela desencadeou a produção significativa de espécies reativas de oxigênio, malondialdeído e níveis elevados de carbonilação de proteínas em *Salmonella enteritidis*, resultando em danos oxidativos irreversíveis às células bacterianas. Paralelamente, verificou-se que o óleo essencial de canela exerceu efeito inibitório sobre a atividade de enzimas protetoras bacterianas, incluindo superóxido dismutase, catalase e peroxidase. Esses resultados indicam uma possível relação entre o óleo essencial de canela e os danos nas paredes celulares das bactérias e, consequentemente, sugerindo um potencial efeito bacteriostático.

Ao testar o óleo essencial de canela vaporizado, Wijesinghe *et al.* (2021) constataram que o composto mantém propriedades antimicrobianas consistentes com os resultados previamente apresentados neste estudo. Essa descoberta reforça a robustez e a replicabilidade das ações antimicrobianas do óleo essencial de canela, consolidando a base científica para seu potencial uso terapêutico por diferentes vias. No estudo realizado por Alibi et al. (2022), os óleos essenciais extraídos de canela e cravo revelaram propriedades antibacterianas notáveis, demonstrando uma significativa redução na formação de biofilme, corroborando com nosso estudo, que como aponta os gráficos os dois melhores óleos para ação antimicrobiana em geral são os de canela e cravo. Logo, tudo indica que a utilização de óleo essencial de canela pode ser uma boa opção para tratamentos que envolvam tratamento antimicrobiano.

Os resultados obtidos com o óleo de cravo indicam, possivelmente, que sua eficácia está associada à presença predominante da molécula de eugenol, que em nosso trabalho representa 79% da composição deste óleo. Em relação a sua ação, a estrutura molecular do eugenol é caracterizada por um anel alifático, o qual demonstra ser tóxico para as membranas de bactérias e fungos. Os nossos resultados também concordam com a pesquisa realizada por Biernasiuk, Baj e Malm (2022) e com Didehdar (2022), que também observaram uma notável eficiência do óleo de cravo como agente antifúngico. Essa convergência de resultados fortalece a hipótese de que o eugenol desempenha um papel significativo na atividade antifúngica.

Os estudos conduzidos por Hu *et al.* (2023), Obuotor *et al*. (2023) e Amarante *et al.* (2023), exploraram os efeitos do óleo essencial de cravo em diversas cepas bacterianas, e este mostrou ter importante contribuição para o campo da atividade antibacteriana. Nossa pesquisa também destaca a relevância dessa substância, corroborando os achados desses estudos anteriores. A sinergia de resultados entre essas investigações fortalece a evidência científica acerca das propriedades antibacterianas do óleo essencial de cravo. Além disso, Hu *et al*. (2023) ampliou sua investigação para incluir os óleos essenciais de canela e orégano, revelando resultados análogos aos observados no presente estudo.

Em relação ao óleo essencial de orégano, o presente estudo mostrou uma notável ação antimicrobiana deste, atribuída, em grande parte, à presença do composto carvacrol e seu anel alifático na molécula, molécula que representa 71,26% do total da composição deste óleo. Os estudos conduzidos por Guo et al. (2022) e Walasek-Janusz et al. (2024) evidenciaram a presença de variações nas concentrações dos princípios ativos do óleo essencial de orégano, notadamente em diferentes ambientes de coleta. Essas discrepâncias nas composições químicas podem desempenhar um papel crucial nas propriedades antimicrobianas do óleo, sugerindo que a eficácia do composto está intrinsecamente ligada às condições ambientais específicas de sua origem. Essas constatações ressalta a importância de considerar não apenas a espécie botânica, mas também as condições geográficas e climáticas durante a análise do óleo essencial de orégano, mostrando que fatores ambientais desempenham um papel crucial na composição química do óleo essencial de orégano, influenciando diretamente a qualidade e potencial terapêutico do produto, sugerindo a necessidade de considerar cuidadosamente a origem geográfica e as condições ambientais durante o processo de cultivo e colheita do orégano, a fim de otimizar a produção de óleo essencial com propriedades desejadas.

No estudo de Luo et al. (2022), a investigação do mecanismo de ação antimicrobiana do óleo essencial de orégano revelou uma redução significativa na concentração intracelular de adenosina trifosfato, juntamente com a hiperpolarização da membrana celular. Além disso, observou-se um aumento notável nos níveis de espécies reativas de oxigênio e na concentração intracelular de malondialdeído. Surpreendentemente, não foram detectados danos óbvios ao DNA nas concentrações testadas do óleo essencial de orégano, sugerindo que o óleo essencial de orégano exerce sua ação antimicrobiana contra *V. vulnificus* por meio da inativação do microrganismo, desencadeando a geração de espécies reativas de oxigênio. Este processo conduz à peroxidação lipídica das membranas celulares, resultando na redução da permeabilidade e integridade delas, além de causar alterações morfológicas nas células. A

ausência de danos evidentes ao DNA sugere um potencial de aplicação clínica do óleo essencial de orégano como agente antimicrobiano eficaz, destacando sua capacidade de atingir alvos específicos sem comprometer a integridade genômica.

Concordando com a literatura os resultados deste trabalho corroboram com ideia da eficácia fungicida do carvacrol em concentrações elevadas, destacando-se como um promissor agente antifúngico. Além disso, a pesquisa respalda descobertas de Pombo (2018), evidenciando a ação antibacteriana de amplo espectro do carvacrol, com ênfase em sua efetividade contra bactérias Gram-positivas. Estes resultados juntamente com os apresentados por Neagu *et al.* (2023) ampliam o escopo dessa propriedade, revelando atividades antibacteriana e antibiofilme do óleo essencial de orégano, o qual juntamente com o oléo essencial de cravo apresentam atividade, na primeira diluição decimal contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas testadas. Embora ambos os efeitos tenham demonstrado uma diminuição proporcional com as diluições em série, é intrigante observar que as diferenças insignificantes entre os óleos essenciais de cravo e orégano quanto à diminuição progressiva da concentração dos compostos destacam nuances importantes em suas composições e potenciais aplicações. Também Silva *et al.* (2023) ao utilizar o oleo essencial de orégano porém em *Klebsiella pneumoniae* apresentou uma eficácia no controle bacteriano dessa cepa, mostrando que o óleo essencial de orégano apresenta um grande espectro antimicrobiano.

O óleo essencial de melaleuca, conforme destacado por Felipe *et al.* (2018), apresenta ação antimicrobiana, possivelmente atribuída à presença significativa de terpinen-4-ol, que chega quase a 50% da composição do óleo. O estudo conduzido por Puvača *et al.* (2021) sobre a concentração de terpinen-4-ol em diferentes óleos essenciais revela a melaleuca como a principal fonte desse princípio ativo. Em nosso estudo observamos que a sua ação bactericida foi eficaz contra a *Escherichia coli*, porém sua ação para outras bactérias e a *Candida albicans* não foi tão eficaz, mesmo este apresentando mais de 40% da composição do óleo essencial utilizado.

De Groot e Schmidt (2016) e Filatov, Kulyak e Kalenikova (2023), mostraram que o óleo de melaleuca tem ação antimicrobiana, sendo esta, diferente conforme o organismo testado. No estudo conduzido por Corona-Gómez *et al.* (2022), foi observada uma abordagem inovadora ao combinar princípios ativos, como timol+carvacrol e terpinen-4-ol+timol. Os resultados revelaram uma atividade aditiva notável, especialmente em relação ao grupo de bactérias gram-negativas e *Candida albicans* indicando a possibilidade de sinergia entre os

agentes utilizados. Já Iseppi (2023) combinou os óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* e *Eucalyptus globulus Labill* para uma maior atividade antimicrobiana.

No estudo conduzido por Borotová *et al.* (2022), foi evidenciado que a melaleuca demonstra uma notável atividade antimicrobiana, destacando-se especialmente contra *E. faecalis*, com resultados expressivos na inibição de seu crescimento. Além disso, a concentração inibitória mínima revelou-se significativa no combate à *C. albicans*, indicando a eficácia da melaleuca como agente antifúngico. O estudo também abordou a capacidade da substância em combater a formação de biofilme de *P. fluorescens*, evidenciando seu potencial no controle de biofilmes bacterianos. Os resultados obtidos no presente estudo também corroboram as descobertas de Ferreira *et al.* (2023), que evidenciaram o notável desempenho antibacteriano do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* contra *Escherichia coli*. Nossos achados, que indicam resultados similares, reforçam a consistência e replicabilidade da atividade antimicrobiana desse óleo essencial. É relevante ressaltar, no entanto, que enquanto Ferreira *et al.* (2023) também investigaram a eficácia virucida contra o SARS-CoV-2, os resultados sugerem que o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* exerce efeito imediato na desativação das partículas de SARS-CoV-2, causando danos às suas proteínas S.

Já o óleo de capim limão nesse estudo, apresentou baixa atividade antimicrobiana, só a cepa *Escherichia coli* mostrou um pequeno halo, outros autores como Castro *et al*. (2011) ao testar o óleo essencial de capim limão comparado com outros óleos também obtiveram resultados semelhantes com baixo efeito antimicrobiano, contudo o efeito antifúngico apresentou alta eficácia. A pesquisa conduzida por Manikandan *et al.* (2021) revelou resultados significativos que apontam para a notável eficácia dos óleos de melaleuca e capim-limão como agentes antibacterianos, especialmente em ambientes alcalinos, destacando-se sua aplicabilidade promissora como componentes em enxaguantes bucais. Esses achados sugerem uma possível correlação entre a eficácia antimicrobiana desses óleos e a alcalinidade do meio, o que pode indicar uma influência direta do ambiente microbiano nas propriedades antibacterianas. Esta observação ressalta a importância de considerar o pH do meio ao avaliar a eficácia de agentes antimicrobianos

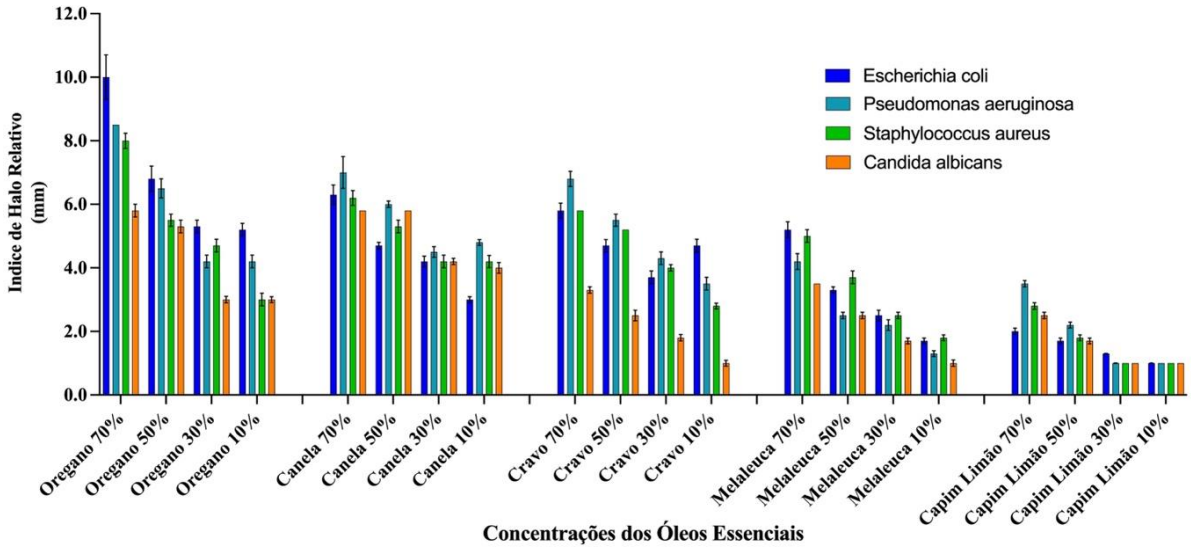
Com base nos resultados obtidos, a investigação dos mecanismos subjacentes à atividade antimicrobiana dos óleos essenciais se torna crucial. Estudos indicam que os compostos bioativos presentes nos óleos, como o eugenol no óleo de cravo e o carvacrol no óleo de orégano, podem comprometer a integridade das membranas celulares dos microrganismos, levando à sua morte (FRIEDMAN, 2016; TROMBETTA *et al.*, 2005). Além disso, a diversidade de terpenos identificados nos óleos essenciais, como terpinen-4-ol no óleo de

melaleuca, sugere uma possível ação sinérgica desses componentes na inibição do crescimento bacteriano (BAKKALI *et al.*, 2008; NAZZARO *et al.*, 2013). A compreensão desses mecanismos de ação é essencial para otimizar o uso terapêutico dos óleos essenciais e desenvolver formulações mais eficazes.

Outro ponto relevante a ser considerado é a influência do método de extração dos óleos essenciais, pois diferentes técnicas podem resultar em composições químicas distintas e, consequentemente, em variações na atividade antimicrobiana (SETTANNI *et al.*, 2017; SOKOVIĆ *et al.*, 2010). Além disso, é importante destacar a importância da seleção criteriosa das espécies microbianas para avaliação da sensibilidade aos óleos essenciais, uma vez que diferentes microrganismos podem exibir respostas variadas devido às suas características fisiológicas e genéticas (BURT, 2004; COX *et al.*, 2000).

Após exposição aos óleos essenciais puros, foram realizadas diluições de cada um dos óleos e novamente realizado análise de disco-difusão, tanto para as bactérias ATCCs como para as resistentes (Figura 4), isto se fez necessário devido ao fato de os óleos essenciais não diluírem em meio de cultura. Para resolver este problema foram preparadas emulsões que permitiram a análise de MIC e Curva de crescimento, as quais são mostradas mais adiante.

Figura 4 *– Resultados relativos das análises de diluição dos óleos realizadas por disco-difusão. O disco utilizado mede 6mm de diâmetro, sendo considerado 6mm quando não ocorreu o aparecimento de halo.*



Fonte: Elaboração própria

Os resultados obtidos mediante a exposição às diluições revelaram a formação de halos, embora em dimensões menores. Notavelmente, os óleos de orégano, canela e cravo demonstraram maior atividade, destacando-se, sobretudo, as propriedades antimicrobianas do orégano e da canela a uma concentração de 70%. Em particular, a *Candida albicans* revelou

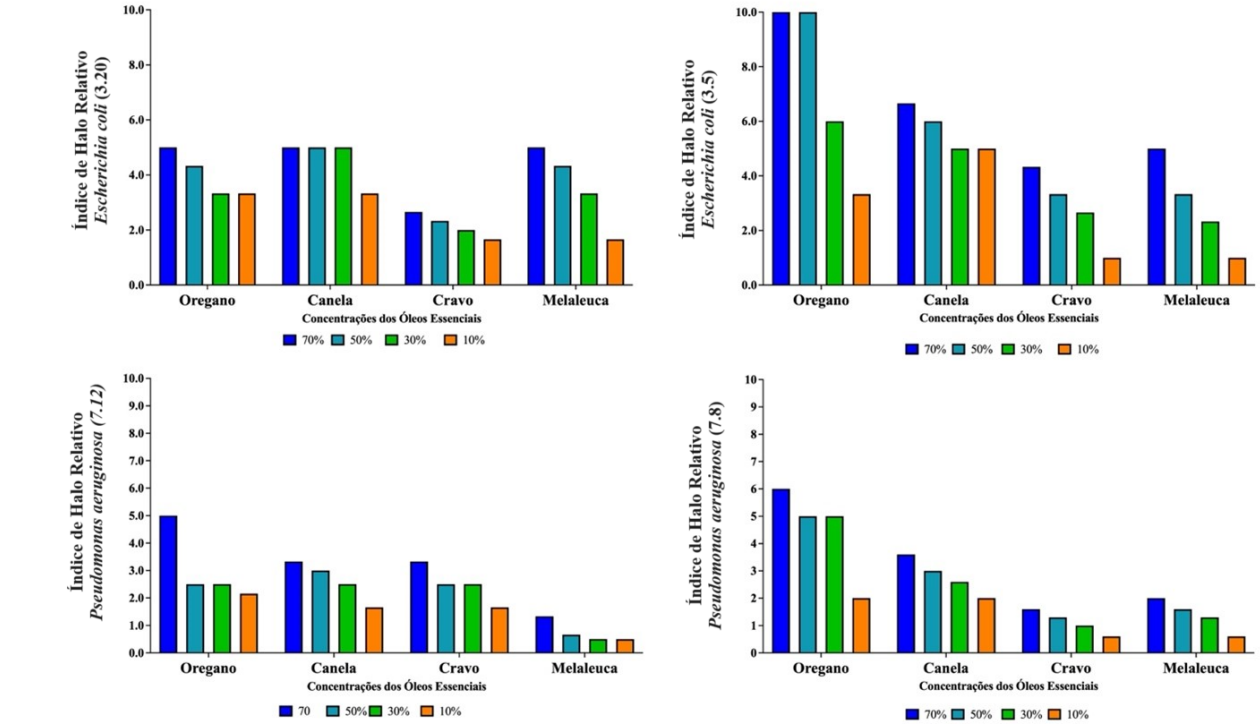
maior sensibilidade aos óleos essenciais de canela e orégano, enquanto os demais óleos testados não apresentaram atividade significativa.

Este estudo alinha-se com a pesquisa conduzida por Man *et al.* (2022) e Fernandes (2023), que investigou os efeitos dos óleos essenciais de canela, orégano e cravo em cinco cepas distintas de *Candida albicans*, cada uma exibindo níveis variados de virulência. Os resultados obtidos neste estudo corroboram com achados notáveis dessa pesquisa anterior. Mesmo em concentrações relativamente baixas, os óleos essenciais demonstraram uma ação antifúngica superior em comparação com o fluconazol, um antifúngico amplamente utilizado na prática clínica.

Esta constatação ressalta a possível eficácia dos óleos essenciais de canela, orégano, cravo e melaleuca como alternativas terapêuticas promissoras contra infecções causadas por cepas de *Candida albicans*, especialmente aquelas caracterizadas por distintos níveis de virulência. Os resultados apresentados neste estudo contribuem, assim, para a compreensão mais aprofundada das propriedades antifúngicas desses óleos essenciais, sugerindo seu potencial de aplicabilidade no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento de infecções fúngicas, representando uma importante contribuição para o avanço da pesquisa na área da microbiologia e saúde.

As mesmas análises foram realizadas testado os óleos essenciais em cepas de bactérias multidrogas resistentes (Figura 5). Os resultados da exposição em bactérias resistentes mostraram que a diluição pode não interferir em alguns casos, isto pode ser dependente do óleo e do microrganismo à que este está sendo exposto.

Figura 5 *– Resultados dos testes de atividade em diferentes concentrações dos óleos essenciais em bateria multidrogas resistentes. As análises estatísticas consideram (a) para concentração 70%, (b) para concentração 50%, (c) para concentração 30% e (d) para concentração 10%. As cepas avaliadas foram Escherichia coli (3.20, amostra de sangue), Escherichia coli (3.5, amostra de urina), Pseudomonas aeruginosa (7.8, amostra urina) e Pseudomonas aeruginosa (7.12, amostra de secreção traqueal).*



Fonte: Elaboração própria

Os resultados mostram que os óleos essenciais de orégano e canela apresentaram ação antimicrobiana em todas as diluições, o óleo essencial de cravo, em concentrações de 70% e 50%, também apresentaram ação antimicrobiana, porém com menor eficiência, já na concentração de 30% apresentou eficácia igual à do controle, não tendo eficácia em concentração de 10%. O óleo de melaleuca em concentrações de 70%, 50% e 30% também apresentaram ação antimicrobiana, principalmente nas cepas 3.20 e 3.5. Esses resultados mostraram que existe uma ligação entre a diluição e a atividade do óleo, sendo que menores diluições menores halos apresentados, porém algumas diluições não apresentaram diferenças significativas indicando a possibilidade de se trabalhar com diluições, resultados semelhantes foram encontrados também por Freire *et al.* (2014), e Pereira *et al*. (2008).

Ao analisar a exposição dos óleos essenciais em cepas de bactérias multidrogas resistentes, a complexidade das interações se torna evidente. Resultados semelhantes foram observados por Khan *et al.* (2019) e por Ghazal *et al.* (2022), que investigaram a ação antimicrobiana de óleos essenciais em cepas resistentes. A variabilidade nas respostas destaca a necessidade de

abordagens personalizadas ao utilizar óleos essenciais como agentes antimicrobianos em ambientes clínicos.

A sensibilidade diferencial de *Candida albicans* aos óleos essenciais de canela e orégano também encontra respaldo na literatura. Pesquisas conduzidas por Ahmad *et al.* (2011) demonstraram a eficácia desses óleos na inibição do crescimento de cepas de *Candida albicans*, corroborando os resultados encontrados neste estudo. Essa especificidade na resposta dos microrganismos ressalta a importância de considerar a diversidade biológica ao avaliar o potencial terapêutico dos óleos essenciais.

Considerando a relevância dos resultados apresentados, é crucial aprofundar a investigação sobre os mecanismos moleculares subjacentes às respostas diferenciadas às diluições. Estudos adicionais, como os conduzidos por Hammer *et al.* (1999) sobre a interação dos componentes dos óleos essenciais com membranas celulares, podem proporcionar *insights* valiosos para a compreensão desses fenômenos, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes no uso terapêutico dos óleos essenciais.

Análises de MIC também foram realizadas, porém existiu a necessidade de se trabalhar com emulsões. Os resultados mostrados na Tabela 2.

Tabela 4 – Resultado das análises de concentração inibitória mínima(MIC) e concentração bactericida mínima(CBM), nos testes realizados com as bactérias multidrogas resistentes.

Óleo essencial	Bactérias	MIC [] em %	CBM [] em %
Orégano	*3.5*	25	-
	3.20	25	-
	7.8	15	35
	7.12	15	35
Canela	*3.5*	**1**	**1**
	3.20	**1**	**1**
	7.8	**1**	**1**
	7.12	**1**	**1**
Melaleuca	*3.5*	**1**	35
	3.20	**1**	25
	7.8	**1**	25
	7.12	**1**	15
Capim limão	*3.5*	25	-
	3.20	35	-
	7.8	35	-
	7.12	35	-
Cravo	*3.5*	15	25
	3.20	***1***	**1**
	7.8	15	35
	7.12	**5**	25

Fonte: Elaboração própria

Nos testes de Concentrações Inibitórias Mínimas foi possível observar que a concentração inibitória mínima dos óleos de Canela e Melaleuca apresentaram excelente atividade quando diluídos, sendo necessário apenas 1% de diluição para inibir crescimento bacteriano, porém apenas o óleo de canela mostrou atividade bactericida nesta concentração. Sendo o óleo de melaleuca bactericida apenas em concentrações mais elevadas (15, 25 e 35%). Esses resultados promissores dos óleos de Canela e Melaleuca nas Concentrações Inibitórias Mínimas destacam a relevância desses compostos como potenciais agentes antimicrobianos.

Estes resultados podem ser atribuídos à composição química única desses óleos, que inclui componentes como o cinamaldeído na canela e o terpinen-4-ol na melaleuca, conhecidos por suas propriedades antimicrobianas (RAUT *et al.*, 2013; CARSON *et al.*, 2006). Estes resultados mostram-se diferentes quanto aos resultados utilizando teste de disco com diluições, podendo sugerir interferência na forma emulsionada. A variação na atividade bactericida entre os dois óleos em concentrações específicas também sugere a necessidade de considerar a complexidade das interações entre os componentes do óleo e as cepas bacterianas (PROBST, 2012). Os achados do estudo de Ginting *et al.* (2021) revelaram resultados congruentes ao empregar os óleos de canela e cravo contra as cepas de *E. coli* e *K. pneumoniae*. A aplicação da técnica de Concentração Inibitória Mínima evidenciou uma marcante atividade antibacteriana dos óleos, corroborando sua eficácia contra ambas as bactérias estudadas. Essa convergência de resultados

sugere que os óleos de canela e cravo possuem propriedades antimicrobianas consistentes e promissoras, destacando-se como agentes potenciais no combate a essas cepas bacterianas

Esta eficácia foi maior quando comparada à observada nos resultados com antibióticos que foram utilizados como e referência (Tabela 1). Comparando esses resultados, destaca-se a importância dos óleos essenciais como alternativas terapêuticas eficazes. Estudos anteriores indicaram a capacidade de certos óleos essenciais, como os provenientes de *Matricaria chamomilla* e *Cinnamomum verum*, em superar a ação de antibióticos tradicionais (Probst, 2012). O mesmo estudo conduzido por Probst (2012), também revelaram notável ação antimicrobiana dos óleos essenciais provenientes de plantas como *Matricaria chamomilla, Cinnamomum verum, Selenicereus undatus e Syzygium aromaticum*, evidenciando a atividade de óleos essenciais como agentes antibacterianos. Além disso, Probst (2012) destaca que cada óleo essencial pode exibir propriedades bactericidas ou bacteriostáticas, uma característica influenciada pelas particularidades das cepas bacterianas envolvidas em seus estudos. Já a pesquisa conduzida por Pereira (2004), revelou que a aplicação do óleo essencial da *Salvia officinalis L*. resultou em uma significativa média de inibição do crescimento bacteriano, superando a eficácia de alguns antibióticos utilizados como controles positivos. Em especial o estudo destaca a eficácia total de 100% do óleo contra cepas de *Klebsiella pneumoniae, Enterobacter aerogenes e Klebsiella oxytoca.*

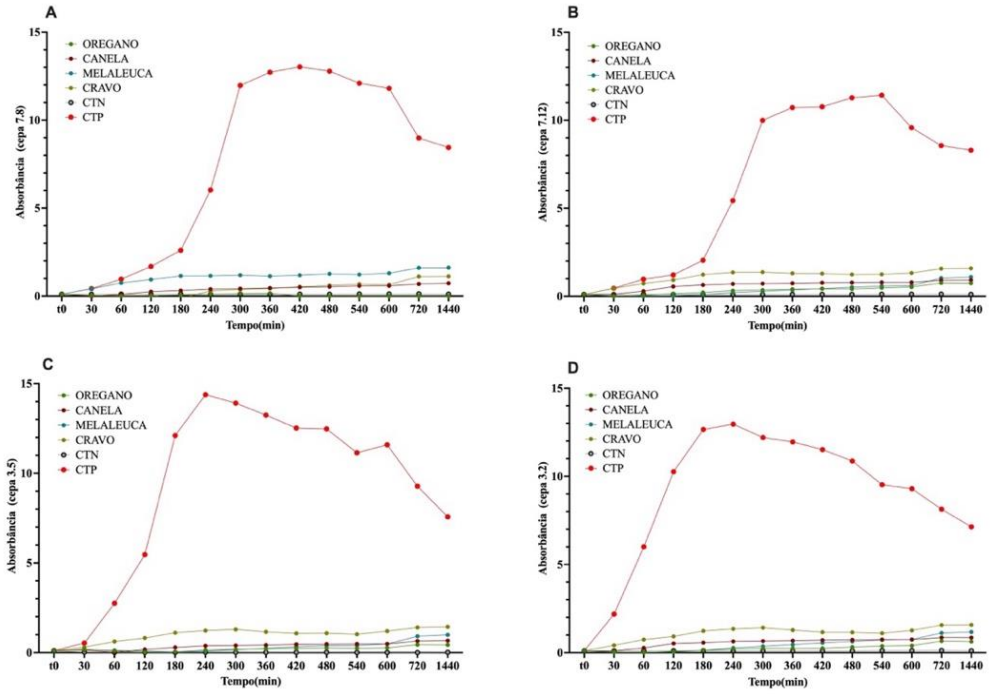
As variações na eficácia dos óleos essenciais contra diferentes cepas bacterianas, conforme observado por Franco *et al.* (2007), apontam que os óleos essenciais de *Aloysia gratíssima* (alfazema do Brasil), *Ocimum gratissimum L.* e *Curcuma longa L*. apresentaram eficácia apenas contra a cepa de *Staphylococcus aureus*, o que sugere a existência de aplicações específicas para cada óleo essencial, porém existe a necessidade de se verificar a resistência da cepa estudada, levando a discussão sobre a eficácia como agentes antimicrobianos de amplo espectro. Além disso, a natureza da bactéria-alvo emerge como um fator crucial na seleção de óleos essenciais com propriedades antibacterianas. A pesquisa de Tantala, Pornchai e Chitsiri (2021), salientam a importância da consideração criteriosa da natureza da bactéria-alvo na seleção de óleos essenciais para fins antibacterianos. A variação na estrutura da membrana bacteriana entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas também é um fator crítico na determinação da eficácia, e deve ser considerado.

Estudos mais recentes de Alibi (2022) apresentaram a mesma eficácia dos óleos de canela e cravo, ao utilizar a Concentração Inibitória Mínima do óleo essencial de cravo exibiu a maior eficácia, seguido pelos óleos essenciais de tomilho e canela. Além disso, observou-se que o

óleo essencial de cravo desempenha um papel significativo como regulador da virulência de Salmonella em nematóides. No estudo conduzido por Yuan *et al*. (2023), foi demonstrado que a aplicação do Método de Inibição de Crescimento utilizando o óleo essencial de orégano resultou na eficaz inibição da virulência cariogênica do *Streptococcus mutans*. Esses resultados corroboram de maneira consistente com as descobertas de nossa própria pesquisa, que se concentrou em diferentes cepas bacterianas. A constatação de que o óleo essencial de orégano possui propriedades inibitórias significativas não apenas valida as descobertas anteriores, mas também ressalta a ampla aplicabilidade dessa abordagem para mitigar a virulência bacteriana em distintos contextos microbiológicos. A pesquisa avança no entendimento das possíveis aplicações dos óleos essenciais como agentes antimicrobianos, ressaltando a necessidade contínua de explorar os mecanismos intricados subjacentes às interações com diferentes tipos de bactérias.

Os resultados derivados da análise dos gráficos de cinética de crescimento bacteriano são congruentes em demonstrar que somente o grupo de controle positivo (controle onde se garantiu o crescimento bacteriano) apresentou crescimento bacteriano (Figura 6), enquanto os grupos tratados com os quatro diferentes óleos essenciais exibiram inibição significativa do crescimento. Este resultado atesta a eficácia dos óleos essenciais testados na cinética de crescimento microbiano, corroborando com a hipótese central deste estudo.

***Figura 6** – Resultados das curvas cineticas de crescimento bacteriano com a utilização das concentrações inibitórias mínimas*



Fonte: Elaboração própria.

O estudo de Torres (2021), mostrou que o extrato de alho (*Allium sativum L.*) apresenta atividade contra grupos B de *estreptococos* proporcionando um efeito antibacteriano notável, mesmo não se tratando de óleos essenciais, isto pode ser um indicativo interessante de que óleo essencial de alho pode ser uma opção no combate a bactérias multidrogas resistentes. O paralelo entre os resultados sugere uma promissora consistência na atividade antimicrobiana dos óleos essenciais, transcendendo a mera ação inibitória de um composto singular. Adicionalmente, a observação de Torres (2021), de que o extrato de alho igualou a penicilina G em termos de atividade antibacteriana ressalta a relevância clínica potencial dos óleos essenciais como alternativas aos antibióticos tradicionais.

A contribuição de Mijatovic *et al*. (2022), com estudo sobre o óleo essencial de *Lavandula angustifolia* e sua ação fungicida sobre cepas de *Candida albicans* ampliou ainda mais a compreensão da aplicabilidade dos óleos essenciais no controle microbiano. Através da técnica de crescimento bacteriano, Mijatovic *et al*. (2022), observaram ação fungicida comparável ao uso de agentes antifúngicos tradicionais, como o fluconazol e a caspofungina. Essa descoberta ressalta a versatilidade dos óleos essenciais não apenas contra bactérias, mas também contra fungos, sugerindo um potencial abrangente para o desenvolvimento de terapias alternativas.

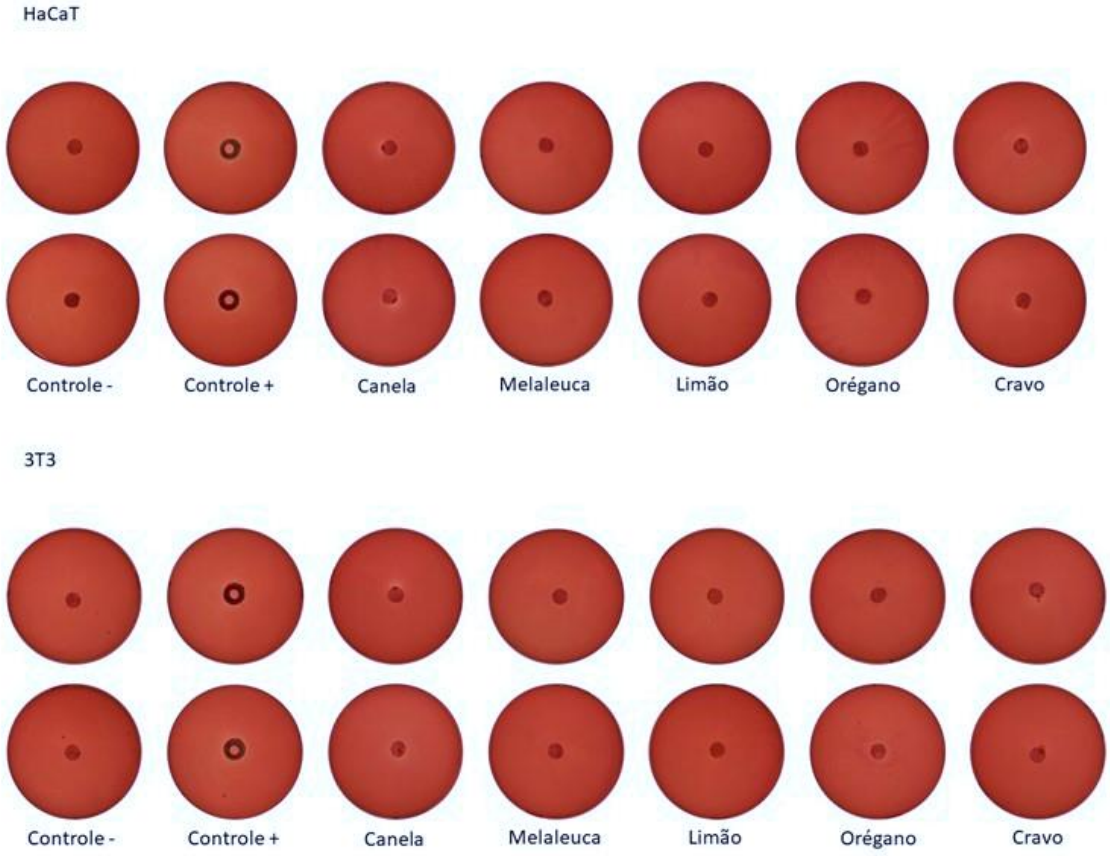
Os resultados deste estudo indicam dados relevantes para a compreensão da eficácia dos óleos essenciais na modulação do crescimento microbiano, reforçando a convergência de evidências provenientes de pesquisas distintas, como as de Torres (2021) e Mijatovic *et al.* (2022). Essa consolidação fortalece o potencial desses compostos como agentes antimicrobianos alternativos, corroborando a perspectiva de que os óleos essenciais apresentam propriedades antimicrobianas promissoras. Além disso, ao integrar os óleos essenciais em nanoemulsões, estudos recentes de Ellboudy *et al.* (2023) e Jeong *et al.* (2021) demonstraram um aumento significativo no potencial antimicrobiano. Essa abordagem inovadora sugere que a nanoemulsificação dos óleos essenciais pode potencializar ainda mais suas propriedades antimicrobianas, oferecendo perspectivas promissoras para aplicações futuras na área. Essas descobertas representam uma contribuição valiosa para a compreensão e aprimoramento da eficácia antimicrobiana dos óleos essenciais, destacando a importância de estratégias de formulações avançadas para otimizar seus benefícios terapêuticos.

5.2 Análise de Cito e genotoxicidade

5.2.1 Análise de Viabilidade Celular

Os testes de viabilidade celular utilizando disco difusão em ágar mostrou que os óleos essenciais em geral não apresentam alterações celulares, porém esta foi observada apenas em culturas expostas ao óleo essencial de canela (Figura 7).

Figura 7 *– Resultados das análises de disco-difusão realizados com linhagens celulares HaCat e 3T3.*



Fonte: Elaboração própria

Para o teste foram utilizados os óleos concentrados, provavelmente o que causou queda na viabilidade quando as células foram expostas ao óleo de canela. Isto indica que os óleos essenciais aparentemente parecem ser seguros. Alguns estudos mostraram a não ocorrência de viabilidade celular em exposição aos óleos essenciais, como mostrado por Ferreira (2014), onde resultados de citotoxidade utilizando óleos essenciais da família Lauraceae não apresentaram queda de viabilidade celular.

Outros estudos complementares têm corroborado a ideia de que, em geral, os óleos essenciais são seguros em termos de viabilidade celular. Uma pesquisa conduzida por Silva *et al.* (2017) investigou os efeitos de óleos essenciais de diferentes plantas medicinais e constatou

que a maioria deles não apresentou significativas alterações na viabilidade celular em ensaios de disco difusão em ágar.

Já estudos realizados por Dantas (2018), onde foram avaliados 13 óleos essenciais diferentes, mostraram que a maioria destes não apresentaram citotoxicidade. Esses resultados são consistentes com as descobertas de Ferreira (2014) e reforçam a perspectiva de que a citotoxicidade não é uma característica intrínseca aos óleos essenciais.

Divergindo dos achados anteriores, GANIĆ *et al.* (2022) destacou uma citotoxicidade significativamente elevada ao utilizar o óleo essencial de canela. enquanto a genotoxicidade não foi objeto de investigação. E cita ainda que a presença de citotoxicidade sugere a necessidade imperativa de análises suplementares para discernir de forma precisa os princípios ativos subjacentes às propriedades antibacterianas e citotóxicas observadas.

Entretanto, é crucial considerar a variação na composição química dos óleos essenciais, pois diferentes concentrações de compostos ativos podem influenciar os resultados. Um estudo realizado por Santos *et al.* (2019) avaliou a citotoxicidade de óleos essenciais de diferentes fontes botânicas e destacou a importância de analisar individualmente cada óleo, dada a diversidade de compostos presentes. Portanto, enquanto muitos óleos essenciais parecem seguros, é essencial conduzir análises específicas para cada componente visando compreender melhor o perfil de citotoxicidade.

Em um estudo conduzido por Oliveira *et al.* (2018), foi observado que óleos essenciais de diferentes origens apresentaram atividade antimicrobiana significativa, sem, no entanto, comprometer a viabilidade celular em concentrações terapeuticamente relevantes. Essa dualidade de propriedades sugere que, em certas condições, os óleos essenciais podem ser benéficos sem causar danos às células. No entanto, a pesquisa destaca a importância de considerar tanto os efeitos citotóxicos quanto as propriedades antimicrobianas ao avaliar a segurança global dos óleos essenciais.

5.2.2 Genotoxicidade em Allium cepa

Os resultados obtidos no teste de *Allium cepa* são apresentados na Figura 8. O gráfico mostra que o índice de mitose apresentou pequena variação comparada com o controle, sendo esta alteração não significativa, indicando que os óleos essenciais não tiveram influência na divisão celular.

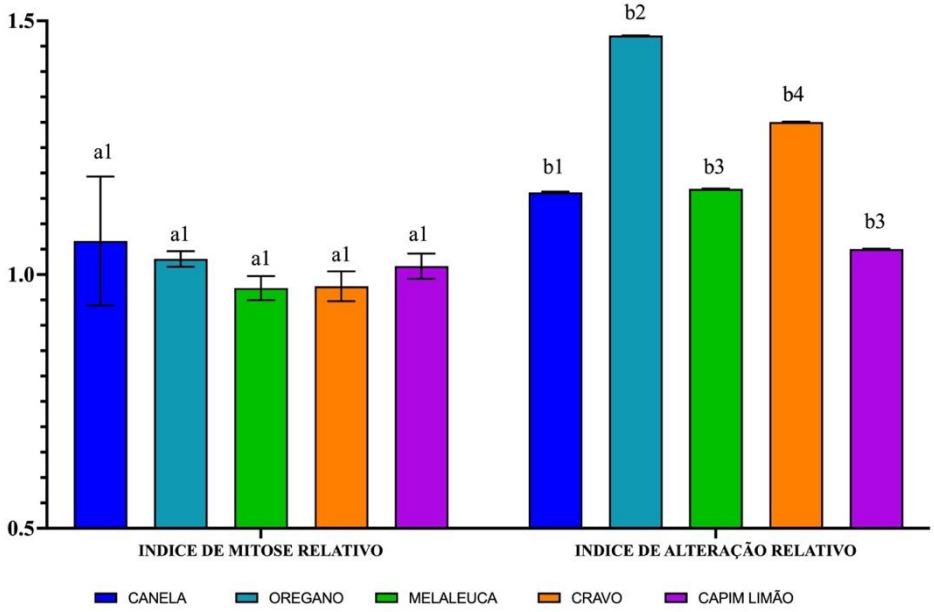
Em relação a genotoxicidade os índices relativos de alterações nucleares mostraram que todos os óleos, em sua forma pura, apresentaram alterações significativas, indicando a ocorrência de alterações no DNA. Sturbelle *et al.* (2010), apresentaram resultados mostrando que os óleos essenciais podem ser usados de forma segura, usando de forma moderada e com dose prescrita. No estudo de Bona (2021), ao utilizarem os óleos de cravo, canela e melaleuca a 10% não obtiveram alterações de genotoxicidade significativa. Já Cruz (2021), mostrou que principalmente no óleo essencial de cravo, se seus principais princípios ativos apresentarem porcentagens altas, o aparecimento de alterações nucleares começa a ser mais numerosos.

Um estudo adicional de Silva *et al.* (2018) corroborou os resultados obtidos, destacando que a análise dos efeitos dos óleos essenciais sobre a genotoxicidade deve considerar não apenas a concentração, mas também a composição química específica de cada óleo. Eles observaram que diferentes compostos presentes nos óleos essenciais podem ter efeitos distintos sobre a estabilidade do material genético, influenciando assim os resultados dos testes de genotoxicidade.

Além disso, as descobertas de Oliveira *et al.* (2019) apontam para a importância de considerar a procedência e a pureza dos óleos essenciais utilizados nos experimentos. Variações na qualidade dos produtos podem resultar em diferentes respostas genotóxicas, enfatizando a necessidade de padronização e controle rigoroso na obtenção e utilização desses compostos.

Contrariamente, um estudo recente de Souza *et al.* (2023) propõe que, além da concentração dos óleos essenciais, fatores como o método de extração e as condições de armazenamento também desempenham um papel significativo na expressão dos efeitos genotóxicos. Eles destacam a complexidade desses compostos e sugerem uma abordagem mais abrangente na avaliação da segurança dos óleos essenciais, levando em consideração múltiplos parâmetros.

Figura 8 *Resultados das análises de Allium cepa realizadas com os óleos essenciais puros. As letras a, indicam comparação estatística entre os resultados de índice mitótico dos O.E. As letras b, indicam a comparação estatística dos resultados dos índices de alteração apresentados em exposição aos O.E.*



Fonte: Elaboração própria

Os resultados mostram que em relação ao índice mitótico não foram encontradas diferenças significativas quando foi realizada a exposição aos óleos essenciais, porém a análise do índice de alteração mostrou que os óleos essenciais de orégano, melaleuca e cravo apresentaram maiores danos, sendo estes significativos quando comparados com os controles. O óleo essencial de orégano foi o que apresentou o índice de alterações mais elevados.

6 CONCLUSÃO

A partir desses resultados podemos concluir que todos os óleos essenciais apresentaram ação antimicrobiana, destacando que os óleos de canela e orégano foram os que apresentaram melhores resultados, principalmente quando testados com bactérias multidrogas resistentes, apresentando também muita eficácia na morte das cepas. Os óleos de cravo e melaleuca apresentaram ação antimicrobiana, porém apenas em concentrações acima dos 50%. E o óleo essencial de capim limão só apresentou eficácia contra *Escherichia coli* quando testado na sua forma pura. Em relação a viabilidade celular o óleo de canela tem indicativo de citotoxicidade, logo deve ser utilizado com cautela quando puro. Outro fato importante é em relação a genotoxicidade apresentada pelos óleos essenciais, em sua forma pura, aonde a maioria foram significativamente genotóxicos, sendo necessário maior aprofundamento nos estudos referentes à genotoxicidade dos óleos essenciais.

REFERÊNCIAS

AHMAD, A., VILJOEN, A., & CHENIA, H. Y. (2011). **The impact of selected essential oils on the growth and morphogenesis of Candida albicans.** Medical Mycology, 49(3), 285-293.

ALIBI, Sana *et al.* **Activity of Essential Oils Against Multidrug-Resistant Salmonella Enteritidis.** Current Microbiology, v. 79, n. 9, p. 273, 2022.

AMARANTE, Jarbas Freitas *et al.* **Synergistic interaction of clove, cinnamon, and eucalyptus essential oils impregnated in cellulose acetate electrospun fibers as antibacterial agents against Staphylococcus aureus**. Brazilian Journal of Microbiology, v. 54, n. 3, p. 1635-1643, 2023.

BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., & IDAOMAR, M. (2008). **Biological effects of essential oils** – A review. Food and Chemical Toxicology, 46(2), 446-475.

BARTLEY, Patricia S. *et al*. **Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae from surface waters in urban Brazil highlights the risks of poor sanitation.** The American journal of tropical medicine and hygiene, v. 100, n. 6, p. 1369, 2019.

BIERNASIUK, Anna; BAJ, Tomasz; MALM, Anna. **Clove essential oil and its main constituent, eugenol, as potential natural antifungals against Candida spp. alone or in combination with other antimycotics due to synergistic interactions**. Molecules, v. 28, n. 1, p. 215, 2022.

BONA, Alliny Magalhães. **Mitigando a toxicidade do óleo de cravo-da-índia durante a anestesia de tilápias (Oreochromis niloticus)**. 2021. Tese de Doutorado. brasil.

BOROTOVÁ, Petra *et al.* **Chemical and biological characterization of Melaleuca alternifolia essential oil.** Plants, v. 11, n. 4, p. 558, 2022.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Prevenção de infecções por microrganismos multirresistentes em serviços de saúde**. Brasília: Ministério da Saúde, 2021a. Disponivel em: https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2021/anvisa-publica-manual-sobre-microrganismos-multirresistentes. **Acesso** em: 23/03/2023

BREITMAIER, Eberhard. **Terpenes: flavors, fragrances, pharmaca, pheromones**. John Wiley & Sons, 2006.

BRITO, Gutemberg. (2010). "**De hospitais ao fundo do mar.**" Retrieved 07/28, 2021, from http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=1023&sid=32.

BROCHOT, Amandine *et al*. **Antibacterial, antifungal, and antiviral effects of three essential oil blends.** Microbiologyopen, v. 6, n. 4, p. e00459, 2017.

BURT, Sara. **Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review.** International journal of food microbiology, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

CANIAUX, I *et al*. (2017). "**MCR: modern colistin resistance**." European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases **36**(3): 415-420.

CARSON, Christine F.; HAMMER, Katherine A.; RILEY, Thomas V. **Melaleuca alternifolia (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties.** Clinical microbiology reviews, v. 19, n. 1, p. 50-62, 2006.

CASTRO, C. E. *et al*. **Antimicrobial activity of Lippia sidoides Cham.(Verbenaceae) essential oil against Staphylococcus aureus and Escherichia coli**. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, v. 13, p. 293-297, 2011.

CECOTTI, Roberto *et al*. **Chemical characterization of the volatiles of leaves and flowers from cultivated Malva sylvestris var. mauritiana and their antimicrobial activity against the aetiological agents of the European and American foulbrood of honeybees (Apis mellifera).** Natural product communications, v. 11, n. 10, p. 1934578X1601101026, 2016.

CHATURVEDI, Trishna *et al*. **Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of senescent leaves of guava (Psidium guajava L.).** Natural product research, v. 35, n. 8, p. 1393-1397, 2021.

CHEN, Yuanting *et al*. **Aerobic oxidation of benzyl alcohol over activated carbon supported manganese and vanadium catalysts: effect of surface oxygen-containing groups.** Catalysis letters, v. 141, p. 149-157, 2011.

CORREIA, Agenor Martinho. *et al*. **Basil, tea tree and clove essential oils as analgesics and anaesthetics in Amphiprion clarkii (Bennett, 1830).** Brazilian Journal of Biology, v. 78, p. 436-442, 2017.

CORONA-GÓMEZ, Lysett *et al.* **In vitro antimicrobial effect of essential tea tree oil (Melaleuca alternifolia), thymol, and carvacrol on microorganisms isolated from cases of bovine clinical mastitis**. International journal of veterinary science and medicine, v. 10, n. 1, p. 72-79, 2022.

COSENTINO, Sofia *et al*. **In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian thymus essential oils**. Letters in applied microbiology, v. 29, n. 2, p. 130-135, 1999.

COSTA, Ana. **Estudo one-pot da aplicação do catalisador de Grubbs de primeira geração em reações de metátese da piperina e eugenol: a influência da ligação dupla terminal.** Química Nova, v. 45, p. 929-934, 2022.

COSTA, Carmen. *et al*. **Efeito inibitório do óleo essencial de manjericão sobre o crescimento in vitro de Erwinia carotovora.** Tecnologia & Ciência Agropecuária, v. 3, n. 3, p. 35-38, 2009.

COX, S. D., MANN, C. M., MARKHAM, J. L., BELL, H. C., GUSTAFSON, J. E., WARMINGTON, J. R., & WYLLIE, S. G. (2000). **The mode of antimicrobial action of the essential oil of Melaleuca alternifolia (tea tree oil)**. Journal of Applied Microbiology, 88(1), 170-175.

CRUZ, Lorena Clara *et al*. **Compostos majoritários presentes em óleos essenciais: caracterização antimicrobiana, toxicológica e antioxidante**. 2021. Dissertação de Mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

DANTAS, Thaisy. "**Óleos essenciais com atividade contra Pseudomonas aeruginosa: uma revisão integrativa."** (2018).

DANTAS, G. M. (2018). **Avaliação da citotoxicidade de óleos essenciais de plantas aromáticas: estudo de 13 diferentes espécies**. Journal of Essential Oil Research, 30(6), 428-440.

DE ALBUQUERQUE, José Maria. **Plantas medicinais de uso popular**. Associação brasileira de educação agrícola superior, 1989.

DE CASTRO, Henrique Guilhon. **Evaluation of content and composition of the essential oil of Cymbopogon nardus (L.)** in different harvest times. Revista Ciencia Agronomica, v. 41, n. 2, p. 308, 2010.

DE FREITAS SOUZA, Jefferson; DIAS, Flavia; DE OLIVEIRA ALVIM, Haline. **Resistência bacteriana aos antibióticos**. Revista JRG de Estudos Acadêmicos, v. 5, n. 10, p. 281-293, 2022.

DE GROOT, A. C.; SCHMIDT, E. **Essential oils, part III: chemical composition.** Dermatitis, v. 27, n. 4, p. 161-169, 2016.

DENG, Weihui *et al*. **Chemical composition, antimicrobial, antioxidant, and antiproliferative properties of grapefruit essential oil prepared by molecular distillation.** Molecules, v. 25, n. 1, p. 217, 2020.

DENKOVA-KOSTOVA, Rositsa *et al*. **Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of essential oils from tangerine (Citrus reticulata L.), grapefruit (Citrus paradisi L.), lemon (Citrus lemon L.) and cinnamon (Cinnamomum zeylanicum Blume).** Zeitschrift für Naturforschung C, v. 76, n. 5-6, p. 175-185, 2021.

DIDEHDAR, Mojtaba; CHEGINI, Zahra; SHARIATI, Aref. **Eugenol: A novel therapeutic agent for the inhibition of Candida species infection**. Frontiers in Pharmacology, v. 13, p. 872127, 2022.

DONATO, Rosa *et al*. **Antifungal activity of different essential oils against Malassezia pathogenic species**. Journal of ethnopharmacology, v. 249, p. 112376, 2020.

DORMAN, HJ–Deans; DEANS, Stanley G. **Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils**. Journal of applied microbiology, v. 88, n. 2, p. 308-316, 2000.

ELLBOUDY, Neveen M. *et al.* **Cinnamon oil-loaded nanoliposomes with potent antibacterial and antibiofilm activities**. Molecules, v. 28, n. 11, p. 4492, 2023.

FALCONE, Paolo. *et al*. **A study on the antimicrobial activity of thymol intended as a natural preservative**. Journal of food protection, v. 68, n. 8, p. 1664-1670, 2005.

FALEIRO, Maria. *et al*. **Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of Thymus. Letters in applied microbiology**, v. 36, n. 1, p. 35-40, 2003.

FELIPE, Lorena de Oliveira *et al*. **Lactoferrin, chitosan and Melaleuca alternifolia-natural products that show promise in candidiasis treatment.** brazilian journal of microbiology, v. 49, p. 212-219, 2018.

FERNANDES, L., COSTA, R., SILVA, S., HENRIQUES, M., COSTA-DE-OLIVEIRA, S., & RODRIGUES, M. E. (2023). **Effect of vapor-phase oregano essential oil on resistant Candida species biofilms: Mechanisms of action.** *Microbiology Spectrum*, *11*(2), e05124-22.

FERREIRA, A. B. (2014). **Avaliação da citotoxicidade dos óleos essenciais de espécies da família Lauraceae**. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, 16(3), 564-570.

FERREIRA, Greiciele da S. *et al*. **Eco-friendly and effective antimicrobial Melaleuca alternifolia essential oil Pickering emulsions stabilized with cellulose nanofibrils against bacteria and SARS-CoV-2.** International Journal of Biological Macromolecules, v. 243, p. 125228, 2023.

FERREIRA, Yuri . **Análise química e farmacológica de óleos essenciais obtidos de espécies vegetais da família Lauraceae.** 2014.

FILATOV, Viktor A.; KULYAK, Olesya Yu; KALENIKOVA, Elena I. **Chemical composition and antimicrobial potential of a plant-based substance for the treatment of seborrheic dermatitis**. Pharmaceuticals, v. 16, n. 3, p. 328, 2023.

FRANCO, Ana Luiza Pereira *et al*. **Avaliação da composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook) Tronc.(Alfazema), *Ocimum gratissimum L.*(Alfavaca-Cravo) e *Curcuma longa L.*(Açafrão)**. 2007.

FRANCO, R. M., PANIZZON, G. P., GRAZZIOTIN, A., & LORENZINI, D. M. (2007). **Óleos essenciais: história, classificação e sua importância na qualidade de vida do homem.** Revista Virtual de Química, 9(3), 738-748.

FREIRE, Isabelle. *et al*. (2014). "**Atividade antibacteriana de Óleos Essenciais sobre Streptococcus mutans e Staphylococcus aureus.**" *Revista Brasileira de Plantas Medicinais* 16: 372-377.

FRIEDMAN, M. (2016). **Antibiotic-resistant bacteria: prevalence in food and inactivation by food-compatible compounds and plant extracts.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 64(18), 3855-3879.

GAO, Zhipeng *et al*. **Chemical composition and anti-biofilm activity of essential oil from Citrus medica L. var. sarcodactylis Swingle against Listeria monocytogenes.** Industrial crops and products, v. 144, p. 112036, 2020.

GANIĆ, Tea *et al.* **Cinnamon essential oil and its emulsion as efficient antibiofilm agents to combat Acinetobacter baumannii**. Frontiers in Microbiology, v. 13, p. 989667, 2022.

GERACI, Anna *et al*. **Essential oil components of orange peels and antimicrobial activity**. Natural product research, v. 31, n. 6, p. 653-659, 2017.

GHAZAL, Tasneem Sultan Abu *et al.* **Antimicrobial, multidrug resistance reversal and biofilm formation inhibitory effect of Origanum majorana extracts, essential oil and monoterpenes**. Plants, v. 11, n. 11, p. 1432, 2022.

GINTING, Elgio Venanda; RETNANINGRUM, Endah; WIDIASIH, Dyah Ayu. **Antibacterial activity of clove (Syzygium aromaticum) and cinnamon (Cinnamomum burmannii) essential oil against extended-spectrum β-lactamase-producing bacteria**. Veterinary world, v. 14, n. 8, p. 2206, 2021.

GUARDABASSI, Luca; PRESCOTT, John F. **Antimicrobial stewardship in small animal veterinary practice: from theory to practice**. Veterinary Clinics: Small Animal Practice, v. 45, n. 2, p. 361-376, 2015.

GUARDABASSI, Luca *et al*. **Optimization of antimicrobial treatment to minimize resistance selection.** Antimicrobial Resistance in Bacteria from Livestock and Companion Animals, p. 637-673, 2018.

GUO, Xiaoqi *et al.* **Comparison of origanum essential oil chemical compounds and their antibacterial activity against Cronobacter sakazakii**. Molecules, v. 27, n. 19, p. 6702, 2022.

Hammer, K. A., Carson, C. F., & Riley, T. V. (1999). **Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts.** Journal of Applied Microbiology, 86(6), 985-990.

HAN, Xuesheng; PARKER, Tory L. **Anti-inflammatory, tissue remodeling, immunomodulatory, and anticancer activities of oregano (Origanum vulgare) essential oil in a human skin disease model**. Biochimie Open, v. 4, p. 73-77, 2017.

HU, Jiajie *et al.* **Emulsions containing composite (clove, oregano, and cinamomo) essential oils: Phase inversion preparation, physicochemical properties and antibacterial mechanism**. Food Chemistry, v. 421, p. 136201, 2023.

ISEPPI, Ramona *et al.* **Effects of Melaleuca alternifolia Chell (Tea Tree) and Eucalyptus globulus Labill. essential oils on antibiotic-resistant bacterial biofilms**. Molecules, v. 28, n. 4, p. 1671, 2023.

JACOBY, Thalita. **Associação entre consumo de antimicrobianos e multirresistência bacteriana em centro de terapia intensiva de hospital universitário brasileiro,** 2004-2006. 2008.

JEONG, Yeo-Jin *et al.* **Antibacterial and antibiofilm activities of cinnamon essential oil nanoemulsion against multi-species oral biofilms.** Scientific Reports, v. 11, n. 1, p. 5911, 2021.

JULIANO, Claudia; MATTANA, Antonella; USAI, Marianna. **Composition and in vitro antimicrobial activity of the essential oil of Thymus herba-barona Loisel growing wild in Sardinia**. Journal of Essential Oil Research, v. 12, n. 4, p. 516-522, 2000.

KASSIROV, Ilia *et al*. (2018). "**Sonochemical nanostructuring of antibiotics is a new approach to increasing their effectiveness against resistant strains.**" Инфекция и иммунитет 8(4): 604.

KHAN, R., ISLAM, B., AKRAM, M., SHAKIL, S., AHMAD, A. A., & ALI, S. M. (2019). **Antimicrobial activity of five herbal extracts against multi drug resistant (MDR) strains of bacteria and fungus of clinical origin**. Molecules, 24(11), 2116.

LANGEVELD, Wendy; VELDHUIZEN, Edwin; BURT, Sara . **Synergy between essential oil components and antibiotics: a review**. Critical reviews in microbiology, v. 40, n. 1, p. 76-94, 2014.

LAXMINARAYAN, Ramanan *et al*. **Antibiotic resistance—the need for global solutions. The Lancet infectious diseases,** v. 13, n. 12, p. 1057-1098, 2013.

LIMA, Renata; DEL FIOL, Fernando; BALCÃO, Victor. **Prospects for the use of new technologies to combat multidrug-resistant bacteria.** Frontiers in Pharmacology, v. 10, p. 692, 2019.

LORENZI, Harri. **Plantas daninhas do Brasil**. 3. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2000.

LUO, Kunyao *et al.* **Antibacterial effect of oregano essential oil against Vibrio vulnificus and its mechanism**. Foods, v. 11, n. 3, p. 403, 2022.

MAN, Adrian *et al.* **Antifungal and anti-virulence activity of six essential oils against important Candida species–a preliminary study**. Future Microbiology, v. 17, n. 10, p. 737-753, 2022.

MANIKANDAN, Saranya *et al.* **Comparative evaluation of the effect of 0.2% chlorhexidine, 2% LemonGrass Oil, and 2% tea tree oil mouth rinse on salivary pH: an in vivo study.** Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences, v. 13, n. Suppl 1, p. S757-S760, 2021.

MCGOWAN JR, John E. **Antimicrobial resistance in hospital organisms and its relation to antibiotic use.** Reviews of infectious diseases, v. 5, n. 6, p. 1033-1048, 1983.

MENDES FERRÃO, José. **Especiarias: Cultura, tecnologia e comercio**. Ministerio do Planejamento e da Administração Território/Secretaria de Estado da Ciencia e Tecnologia/ Instituto de Investigação Cientifica Tropical, Lisboa, 1993. 443 p.

MERTAS, Anna *et al*. **The influence of tea tree oil (Melaleuca alternifolia) on fluconazole activity against fluconazole-resistant Candida albicans strains**. BioMed Research International, v. 2015, 2015.

MIJATOVIC, Stefan *et al*. **Antifungal Activity of Lavandula angustifolia Essential Oil against Candida albicans: Time-Kill Study on Pediatric Sputum Isolates.** Molecules, v. 27, n. 19, p. 6300, 2022.

MONTES-BELMONT, Roberto; CARVAJAL, Micaela. **Control of Aspergillus flavus in maize with plant essential oils and their components**. Journal of food protection, v. 61, n. 5, p. 616-619, 1998.

MONZOTE, Lianet *et al*. **Pharmacological assessment of the carvacrol chemotype essential oil from Plectranthus amboinicus growing in Cuba**. Natural Product Communications, v. 15, n. 10, p. 1934578X20962233, 2020.

MOTA, Aquiles Paulino Peres. **Atividade antimicobacteriana do óleo essencial da casca de Cinnamomum zeylanicum e do trans-cinamaldeído e suas associações com rifampicina e isoniazida**. 2017.

MOURA, Jhonatan Costa. **Efeito anti-hipertensivo do carvacrol: parâmetros hemodinâmicos e bioquímicos**. 2022.

MUNITA, Jose.; ARIAS, Cesar. **Mechanisms of antibiotic resistance**. Virulence mechanisms of bacterial pathogens, p. 481-511, 2016.

NAZER, Al. *et al*. **Combinations of food antimicrobials at low levels to inhibit the growth of Salmonella sv. Typhimurium: a synergistic effect?**. Food microbiology, v. 22, n. 5, p. 391-398, 2005.

NAZZARO, F., FRATIANNI, F., DE MARTINO, L., COPPOLA, R., & DE FEO, V. (2013). **Effect of essential oils on pathogenic bacteria**. Pharmaceuticals, 6(12), 1451-1474.

NEAGU, Răzvan *et al.* **Antibacterial and antibiofilm effects of different samples of five commercially available essential oils.** Antibiotics, v. 12, n. 7, p. 1191, 2023.

OBUOTOR, Tolulope Mobolaji *et al.* **In vitro and in silico antibacterial activities of Syzgium aromaticum essential oil against bacteria associated with otitis media in children**. African Journal of Infectious Diseases, v. 17, n. 1, p. 27-44, 2023.

OLIVEIRA, R. G., *et al.* (2018). **Atividade antimicrobiana e citotoxicidade de óleos essenciais de diferentes plantas medicinais.** Journal of Medicinal Plants Research, 12(19), 249-257.

OLIVEIRA, R.F., *et al.* (2019). **Influência da procedência e qualidade de óleos essenciais na genotoxicidade**. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A, 82(15), 855-868.

ONAWUNMI, Grace; YISAK, Wolde-Ab; OGUNLANA, E. O. **Antibacterial constituents in the essential oil of Cymbopogon citratus (DC.**) Stapf. Journal of Ethnopharmacology, v. 12, n. 3, p. 279-286, 1984.

OUATTARA, Blaise *et al*. **Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms.** International journal of food microbiology, v. 37, n. 2-3, p. 155-162, 1997.

OUSSALAH, Mounia *et al*. **Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a Pseudomonas putida strain isolated from meat**. Meat science, v. 73, n. 2, p. 236-244, 2006.

PANDINI, Jessica. *et al*. **Chemical composition, antimicrobial and antioxidant potential of the essential oil of Guarea kunthiana A. Juss.** Brazilian Journal of Biology, v. 78, p. 53-60, 2017.

PATERSON, David; BONOMO, Robert. **Extended-spectrum β-lactamases: a clinical update.** Clinical microbiology reviews, v. 18, n. 4, p. 657-686, 2005.

PATTNAIK, Smaranika *et al*. **Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils.** Microbios, v. 89, n. 358, p. 39-46, 1997.

PEREIRA, Alcilene *et al*. **Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de Staphylococcus aureus e Escherichia coli.** Ciência e Agrotecnologia, v. 32, p. 887-893, 2008.

PEREIRA, Rogério Santos *et al*. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais em cepas isoladas de infecção urinária.** Revista de Saúde Pública, v. 38, p. 326-328, 2004.

Pereira, U. P. (2004). **Ação antimicrobiana de óleos essenciais de plantas da flora brasileira.** Revista Brasileira de Plantas Medicinais, 7(2), 46-49.

PRIETO, José. *et al*. **In vitro activity of the essential oils of Origanum vulgare, Satureja montana and their main constituents in peroxynitrite-induced oxidative processes**. Food Chemistry, v. 104, n. 3, p. 889-895, 2007.

PRINS, Cláudia *et al*. **Efeito do confinamento do sistema radicular sobre capim-limão (Cymbopogon citratus)**. Revista Ciência Agronômica, v. 39, n. 3, p. 416-421, 2008.

PROBST, Isabella Da Silva. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico.** 2012. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências

PUVAČA, Nikola et al. **Antimicrobial activity of selected essential oils against selected pathogenic bacteria: In vitro study. Antibiotics,** v. 10, n. 5, p. 546, 2021.

RADÜNZ, Marjana *et al*. **Antimicrobial and antioxidant activity of unencapsulated and encapsulated clove (Syzygium aromaticum, L.) essential oil**. Food chemistry, v. 276, p. 180-186, 2019.

RHAYOUR, Khadija *et al*. **The mechanism of bactericidal action of oregano and clove essential oils and of their phenolic major components on Escherichia coli and Bacillus subtilis**. Journal of essential oil research, v. 15, n. 5, p. 356-362, 2003.

RAUT, J. S., KARUPPAYIL, S. M., & BHUTADA, S. A. (2013). **Comparative analysis of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of lavender (Lavandula angustifolia) essential oils obtained by supercritical CO2 extraction and steam distillation**. Food and Chemical Toxicology, 55, 456-464.

SANTOS, J. R., *et al.* (2019). **Citotoxicidade de óleos essenciais de plantas medicinais: uma análise comparativa.** Acta Scientiarum. Health Sciences, 41(2), 445-452.

SETTANNI, L., PALAZZOLO, E., GUARRASI, V., ALEO, A., MAMMINA, C., MOSCHETTI, G., & GERMANÀ, M. A. (2017). **Rapid detection and quantification of the volatile secondary metabolites produced by toxigenic molds in vitro and on cereal grains by HS-SPME-GC/MS**. Frontiers in Microbiology, 8, 1646.

SHARIFI-RAD, Javad *et al*. **Biological activities of essential oils: From plant chemoecology to traditional healing systems**. Molecules, v. 22, n. 1, p. 70, 2017.

SHIMIZU, Mineo *et al*. **Anti-inflammatory Constituents of Topically Applid Crude Drugs. IV.: Constituents and Anti-inflammatory Effect of Paraguayan Crude Drug" Alhucema"(Lavandula latifolia VILL.)**. Chemical and pharmaceutical bulletin, v. 38, n. 8, p. 2283-2284, 1990.

SILVA, A.B., *et al.* (2018). **Avaliação da genotoxicidade dos óleos essenciais de plantas medicinais.** Revista Brasileira de Farmacognosia, 28(3), 346-354.

SILVA, Janine. *et al*. **Effects of oregano essential oil and nisin on growth of gram positive and gram negative foodborne pathogens.** In: INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR FOOD PROTECTION ANNUAL MEETING. 2005.

SILVA, M. R., *et al.* (2017). **Efeito dos óleos essenciais de plantas medicinais na viabilidade celular: uma abordagem de disco difusão em ágar.** Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, 38(2), 235-240.

SILVA, S. L. *et al.* **Evaluation of the antimicrobial effect of the Origanum vulgare L essential oil on strains of Klebsiella pneumoniae.** Brazilian Journal of Biology, v. 83, p. e269317, 2023.

SIM, Jowenna. *et al*. **Antimicrobial activity of thyme oil, oregano oil, thymol and carvacrol against sensitive and resistant microbial isolates from dogs with otitis externa**. Veterinary dermatology, v. 30, n. 6, p. 524-e159, 2019.

SIMOES, Claudia de O. SPITZER. V. SIMÕES, CMO, SCHENKEL, EP, GOSMANN, G., MELLO, JCP, MENTZ, LA, PETROVICK, PR. **Óleos voláteis**.Farmacognosia: da planta ao medicamento, v. 2, p. 387-415, 1999.

SIMONA, Jancikova *et al*. **Edible films from carrageenan/orange essential oil/trehalose—structure, optical properties, and antimicrobial activity**. Polymers, v. 13, n. 3, p. 332, 2021.

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

SOKOVIĆ, M., GLAMOČLIJA, J., MARIN, P. D., BRKIĆ, D., & VAN GRIENSVEN, L. J. (2010). **Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an in vitro model.** Molecules, 15(11), 7532-7546.

SOMMER, Svenja *et al*. **Odor Characteristics of Novel Non-Canonical Terpenes**. Molecules, v. 27, n. 12, p. 3827, 2022.

SOUZA, M.C., *et al.* (2023). **Efeitos genotóxicos dos óleos essenciais: uma abordagem abrangente.** Journal of Environmental and Molecular Mutagenesis, 45(2), 123-136.

STURBELLE, Régis. *et al*. **Avaliação da atividade mutagênica e antimutagênica da Aloe vera em teste de Allium cepa e teste de micronúcleo em linfócitos humanos binucleados**. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 20, p. 409-415, 2010.

TANTALA, Juthamas; RACHTANAPUN, Pornchai; RACHTANAPUN, Chitsiri. (2021). **Antimicrobial activity of essential oils against Gram-positive and Gram-negative bacteria**. Journal of Essential Oil Research, 33(2), 117-130

TANTALA, Juthamas; RACHTANAPUN, Pornchai; RACHTANAPUN, Chitsiri. **Synergistic antimicrobial activities of thai household essential oils in chitosan film.** Polymers, v. 13, n. 9, p. 1519, 2021.

TARIQ, Saika *et al*. **A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens**. Microbial pathogenesis, v. 134, p. 103580, 2019.

THOMAS, Christopher; NIELSEN, Kaare. **Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria.** Nature reviews microbiology, v. 3, n. 9, p. 711-721, 2005.

TORRES, Filipa Silva. **Allium Sativum: Evidência Científica. Allium Sativum:** Evidência Científica, 2021.

TROMBETTA, D., CASTELLI, F., SARPIETRO, M. G., VENUTI, V., CRISTANI, M., DANIELE, C., ... & SAIJA, A. (2005). **Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. Antimicrobial Agents and Chemotherapy,** 49(6), 2474-2478.

VAN ZYL, Robyn. *et al*. **The biological activities of 20 nature identical essential oil constituents.** Journal of Essential Oil Research, v. 18, n. sup1, p. 129-133, 2006.

VENTOLA, C. Lee. **The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. Pharmacy and therapeutics**, v. 40, n. 4, p. 277, 2015.

VIAZIS, Stelios *et al*. **Reduction of Escherichia coli O157: H7 viability on leafy green vegetables by treatment with a bacteriophage mixture and trans-cinnamaldehyde. Food microbiology**, v. 28, n. 1, p. 149-157, 2011.

VUJICIC, Milica *et al*. **Methanolic extract of Origanum vulgare ameliorates type 1 diabetes through antioxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic activity**. British Journal of Nutrition, v. 113, n. 5, p. 770-782, 2015.

WALASEK-JANUSZ, Magdalena *et al.* **Chemical Composition, and Antioxidant and Antimicrobial Activity of Oregano Essential Oil**. Molecules, v. 29, n. 2, p. 435, 2024.

WIJESINGHE, Gayan Kanchana *et al.* **Efficacy of true cinnamon (Cinnamomum verum) leaf essential oil as a therapeutic alternative for Candida biofilm infections.** Iranian journal of basic medical sciences, v. 24, n. 6, p. 787, 2021.

WILSON, Daniel. (2014). **Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance.** Nature Reviews Microbiology, 12(1), 35–48. DOI: http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3155

WU, Weihua *et al*. **Rapid discovery and functional characterization of terpene synthases from four endophytic Xylariaceae**. PLoS One, v. 11, n. 2, p. e0146983, 2016.

YAO, Jin-Long *et al*. **A review on the terpenes from genus Vitex**. Molecules, v. 21, n. 9, p. 1179, 2016.

YOUCEF-ETTOUMI, Khadidja; ZOUAMBIA, Yamina; MOULAI-MOSTEFA, Nadji. **Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of Algerian Citrus sinensis essential oil extracted by hydrodistillation assisted by electromagnetic induction heating**. Journal of Food Science and Technology, v. 58, p. 3049-3055, 2021.

YUAN, Yue *et al.* **Antibacterial activity of oregano essential oils against Streptococcus mutans in vitro and analysis of active components**. BMC Complementary Medicine and Therapies, v. 23, n. 1, p. 61, 2023.

ZHANG, Zhen *et al.* **Effects of cinnamon essential oil on oxidative damage and outer membrane protein genes of Salmonella enteritidis cells**. Foods, v. 11, n. 15, p. 2234, 2022.