



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS EM SAÚDE

**Formulação de nanoemulsões, avaliação da atividade antibacteriana e da
composição química de óleos essenciais de alecrim do campo (*Baccharis
dracunculifolia*)**

ERIKA DA SILVA MONTEIRO

Brasília
2021

ERIKA DA SILVA MONTEIRO

Formulação de nanoemulsões, avaliação da atividade antibacteriana e da composição química de óleos essenciais de alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologias em Saúde como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi

Coorientadora: Profa. Dra. Livia Cristina Lira de Sá Barreto

Brasília
2021

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

dD111f da Silva Monteiro, Erika
Formulação de nanoemulsões, avaliação da atividade antibacteriana e da composição química de óleos essenciais de alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*) / Erika da Silva Monteiro; orientador Daniela Castilho Orsi; co orientador Livia Cristina Lira de Sá Barreto. -- Brasília, 2021.
146 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Ciências e Tecnologias em Saúde) -- Universidade de Brasília, 2021.

1. *Baccharis dracunculifolia*. 2. Óleo essencial. 3. Resistência bacteriana. 4. CIM e CBM. 5. Nanoemulsão. I. Castilho Orsi, Daniela, orient. II. Cristina Lira de Sá Barreto, Livia, co-orient. III. Título.

ERIKA DA SILVA MONTEIRO

**Formulação de nanoemulsões, avaliação da atividade antibacteriana e da
composição química de óleos essenciais de alecrim do campo (*Baccharis
dracunculifolia*)**

Banca Examinadora

Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi (Presidente)
Universidade de Brasília

Profa. Dra. Luciana Francisco Fleuri
Universidade Estadual Paulista

Prof. Dr. Breno Noronha Matos
Faculdade Unieuro

Prof. Dr. Alex Pereira Leite (Suplente)
Universidade de Brasília

SUMÁRIO

1. REVISÃO DA LITERATURA	15
1.1. Família <i>Asteraceae</i> e o Gênero <i>Baccharis</i>	15
1.2. <i>Baccharis dracunculifolia</i>	17
1.3. Óleos Essenciais: aspectos históricos e usos industriais	19
1.4. Definição, composição e biossíntese dos óleos essenciais e outros metabólitos secundários de plantas	22
1.4.1 Biossíntese dos terpenos	24
1.4.2. Biossíntese dos fenilpropanoides.....	27
1.4.2.2. Biossíntese dos monolignóis e fenilpropanos.....	30
1.4.2.3. Biossíntese das cumarinas.....	31
1.4.2.4. Biossíntese dos Ácidos Fenólicos	31
1.5. Fatores que influenciam na produção e composição dos óleos essenciais.....	32
1.5.1. Influência dos fatores ambientais na produção e composição dos óleos essenciais e outros metabólitos secundários de plantas	33
1.5.2. Influência dos processos de extração no rendimento e composição dos óleos essenciais	37
1.6. Atividade antioxidante dos óleos essenciais.....	39
1.7. Mecanismos de ação antibacteriana dos óleos essenciais	40
1.8. Determinação da atividade antibacteriana dos óleos essenciais	43
1.9. Resistência Bacteriana.....	45
1.9.1. Resistência bacteriana em bactérias Gram-positivas	48
1.9.2. Resistência bacteriana em bactérias Gram-negativas	50
1.10. A busca por novos agentes antibacterianos	51
1.11. Nanocompostos	53
2. OBJETIVOS	57
2.1. OBJETIVOS GERAIS	57
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	57
3. METODOLOGIA	58
3.1. Amostras de óleos essenciais de <i>B. dracunculifolia</i>	58
3.2. Determinação da atividade antibacteriana das três amostras de óleos essenciais de <i>B. dracunculifolia</i> e das nanoemulsões contendo óleo essencial de <i>B. dracunculifolia</i>	58
3.2.1. Preparo dos inóculos	58
3.2.2. Atividade antimicrobiana avaliada pelo método de difusão em disco.....	58
3.2.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM)	59

3.3. Análises de composição química das três amostras de óleos essenciais de <i>B. dracunculifolia</i>.....	60
3.3.1. Determinação de compostos fenólicos e atividade antioxidante	60
3.3.2. Análise de Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	60
3.4. Nanoemulsões contendo óleo essencial de <i>B. dracunculifolia</i>	60
3.4.1. Preparo das Nanoemulsões.....	60
3.4.2. Caracterização das nanoemulsões	62
3.5. Análise Estatística	62
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
4.1. Atividade antibacteriana dos óleos essenciais de <i>B. dracunculifolia</i>	62
4.2. Propriedades químicas dos óleos essenciais de <i>B. dracunculifolia</i>	65
4.3. Caracterização das nanoemulsões contendo óleo essencial de <i>B. dracunculifolia</i>	69
4.4. Atividade antibacteriana das nanoemulsões contendo óleo essencial de <i>B. dracunculifolia</i>	74
5. CONCLUSÃO	81
6. REFERÊNCIAS	82

RELAÇÃO DE TABELAS

Tabela 1. Mecanismo de ação antibacteriana proposto para diversos óleos essenciais.....	43
Tabela 2. Composição das nanoemulsões contendo óleo essencial de <i>B. dracunculifolia</i>	61
Tabela 3. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de <i>B. dracunculifolia</i> avaliada pelo método de difusão em disco.	63
Tabela 4. Concentrações Inibitórias Mínimas (MIC) e Concentrações Bactericidas Mínimas (MBC) dos óleos essenciais de <i>B. dracunculifolia</i>	64
Tabela 5. Atividade antioxidante e conteúdo de compostos fenólicos dos óleos essenciais de <i>B. dracunculifolia</i>	66
Tabela 6. Caracterização das nanoemulsões contendo óleo essencial de <i>B. dracunculifolia</i> ..	69
Tabela 7. CIM e CBM das nanoemulsões formuladas com óleo essencial de <i>B. dracunculifolia</i>	74
Tabela 8. Comparação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) da nanoemulsão e dos óleos in natura.	77
Tabela 9. Comparação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) da nanoemulsão e dos óleos in natura.....	78
Tabela 10. Comparação entre os resultados de disco-difusão encontrados para a nanoemulsão e para os óleos in natura.	76

RELAÇÃO DE FIGURAS

Figura 1. Arbusto de <i>Baccharis dracunculifolia</i>	17
Figura 2. Esquema biossintético dos terpenos.....	25
Figura 3. Diferentes estruturas químicas dos monoterpenos.....	26
Figura 4. Estruturas químicas dos monoterpenos e sesquiterpenos acíclicos, monocíclicos e bicíclicos.....	27
Figura 5. Estruturas químicas de monoterpenos, fenilpropanoides (aldeído cinâmico ou cinamaldeído, safrol e eugenol) e sesquiterpenos (E-nerolidol e E, E-farnesol) encontrados nos óleos essenciais.....	28
Figura 6. Esquema dos vários pontos de ramificação na biossíntese dos compostos fenólicos.	29
Figura 7. Representação dos mecanismos de transferência de genes de resistência adquiridos.	47
Figura 8. Mecanismos moleculares de resistência aos antimicrobianos	47
Figura 9. Escala comparativa do tamanho de determinados materiais. Os nanomateriais tem uma dimensão característica na faixa de tamanho de 1 a 100 nm.	54
Figura 10. Nanoemulsões de óleo essencial de <i>B. dracunculifolia</i> nas concentrações de óleo essencial em 20% (1), 15% (2), 10% (3), 7,5% (4), 5% (3) e 2,5% (6).	61
Figura 11. Espectros de FTIR de: A) óleo essencial de <i>B. dracunculifolia</i> da região Centro-Oeste do Brasil; B) óleo essencial de <i>B. dracunculifolia</i> da região Sudeste do Brasil; C) óleo essencial de <i>B. dracunculifolia</i> da região Sul do Brasil.	68
Figura 12. Cálculo da razão óleo-surfactante (SOR).	71

RELAÇÃO DE ANEXOS

ANEXO 1: Comprovante de submissão do artigo.....	115
ANEXO 2: Qualis capes da revista.....	116
ANEXO 3 – Artigo submetido na revista Natural Product Research.....	117
ANEXO 4: Regras de submissão da revista.....	140

RELAÇÃO DAS SIGLAS E ABREVIATURAS

ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
ATCC	American Type Culture Collection
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CHS	Chalcona-sintase
CHI	Chalcona-isomerase
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
cm	Centímetro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMAPP	Dimetilalil difosfato
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DXP	1-desoxi-d-xilolose-5-fosfato
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
FTIR	Infravermelho por transformada de Fourier
GAE	Equivalente de ácido gálico
GPP	Via central dos fenilpropanoides
IPP	Isopentenil difosfato
IR	Infravermelho
MDR	Resistência a múltiplas drogas
MEP	Via não mevalônica
mg	Miligrama
mm	Milímetro
mL	Mililitro
Mmol	Milimol
MLSb	Macrolídeo-lincosamida-estreptogramina B
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
MVA	Via do ácido mevalônico
mV	Milivolt
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDI	Índice de Polidispersão
pH	Potencial hidrogeniônico

RNA	Ácido ribonucleico
SOR	Razão Óleo-Surfactante
TEAC	Capacidade antioxidante equivalente a Trolox
TE	Trolox Equivalente
UFC	Unidade Formadora de Colônia
μL	Microlitros
μS	Microsiemens
VRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à vancomicina

RESUMO

Introdução: A espécie *Baccharis dracunculifolia*, comumente conhecida como alecrim do campo no Brasil, tem impulsionado o interesse de pesquisadores, no sentido de investigar suas propriedades biológicas, em especial o seu óleo essencial. Os óleos essenciais são compostos de fácil degradação e uma proposta para preservação de suas propriedades biológicas é por meio do uso de nanotecnologia. A incorporação dos óleos essenciais em nanoemulsões além de proteger o princípio ativo contra ações de degradações ambientais, pode aumentar a sua solubilidade. **Objetivos:** Considerando o aumento da resistência bacteriana, a importância da busca por novos compostos com potencial antibacteriano e a as vantagens da nanoestruturação dos óleos essenciais, esse estudo teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana e a composição química do óleo essencial de *B. dracunculifolia* de três regiões do Brasil e realizar a nanoestruturação do óleo essencial por meio da produção de nanoemulsões para potencialização da ação antibacteriana. **Metodologia:** Foram obtidas três amostras de óleo essencial de *B. dracunculifolia*: uma amostra proveniente da cidade de Brasília, Distrito Federal (região Centro-oeste do Brasil), a segunda amostra foi obtida na cidade de Estiva Gerbi, São Paulo (região Sudeste do Brasil), e a terceira amostra foi obtida na cidade de Canelinha, Santa Catarina (região Sul do Brasil). A atividade antibacteriana dos óleos essenciais e nanoemulsões foi avaliada contra oito cepas bacterianas por determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) e da Concentração Bactericida Mínima (MBC). Os óleos essenciais foram avaliados quanto ao teor de compostos fenólicos (Folin-Denis) e atividade antioxidante através da redução dos radicais 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) e ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS). Também foi realizada a análise dos óleos essenciais por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). As formulações de nanoemulsões contendo óleo essencial de *B. dracunculifolia* foram obtidas por ultrasonicação e foram avaliadas por meio de tamanho das gotículas (diâmetro), índice de polidispersão (PDI), potencial Zeta, valor de pH, condutividade e valor de SOR (razão óleo-surfactante). **Resultados:** Os três óleos essenciais de *B. dracunculifolia* apresentaram atividade antimicrobiana para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas testadas, com valores de CIM de 0,03 a 0,15 mg/mL e valores de CBM de 0,05 a 0,30 mg/mL. O óleo essencial da região Centro-Oeste do Brasil apresentou valores de atividade antioxidante mais elevados e estatisticamente significativos em relação aos óleos das regiões Sudeste e Sul do Brasil, e os óleos essenciais das regiões Centro-Oeste e Sul do Brasil apresentaram valores mais elevados e estatisticamente significativos de teor de compostos fenólicos em relação ao óleo da região Sudeste do Brasil. Para os valores de CIM

das nanoemulsões, estes variaram de $<0,03$ a $0,08$ mg/mL para bactérias Gram-positivas e de $<0,03$ a $0,15$ mg/mL para bactérias Gram-negativas e os valores de CBM variaram entre $0,10$ e $0,20$ mg/mL para Gram-positivas e todos os valores foram $>0,20$ mg/mL para Gram-negativas. Para a caracterização da nanoemulsões, estas apresentaram diâmetro entre $13,14 \pm 2,65$ e $56,84 \pm 0,80$ nm, valores de SOR entre $0,50$ e $0,89$, valores de PDI entre $0,12 \pm 0,03$ e $0,35 \pm 0,07$, potencial Zeta entre $4,14 \pm 0,91$ e $23,03 \pm 2,15$ -mV, condutividade entre $105,70$ e $120,80$ μ S/cm e pH entre $6,73$ e $7,55$. **Conclusão:** O óleo essencial da região Centro-Oeste do Brasil foi mais eficaz sobre todas as cepas bacterianas testadas, com valores de CBM menores e estatisticamente significantes e apresentou maior capacidade antioxidante em relação aos óleos das regiões Sudeste e Sul do Brasil. Devido às características climáticas da região do Cerrado brasileiro, marcada pelo inverno seco, é possível que a baixa umidade relativa do ar e a falta de precipitação no período de coleta das folhas tenham favorecido o aumento da atividade biológica para esta espécie. Em relação as nanoemulsões, os testes de caracterização apresentaram resultados considerados adequados para o tipo de sistema formulado, exceto para os valores de potencial Zeta, fator este que pode estar relacionado ao tamanho diminuto das gotículas produzidas. Para a avaliação antibacteriana, percebe-se resultados satisfatórios com as nanoemulsões para seis das oito cepas testadas, nos testes de Concentração Inibitória Mínima, indicando uma potencialização da ação bacteriostática. Os resultados deste estudo demonstram que o óleo essencial de *B. dracunculifolia* é um composto natural com relevante atividade antibacteriana e a formulação de nanoemulsões pode promover uma potencialização das propriedades biológicas apresentadas por ele.

Palavras-chave: *Baccharis dracunculifolia*, óleo essencial, resistência bacteriana, CIM, CBM, nanoemulsão.

ABSTRACT

Introduction: The species *Baccharis dracunculifolia*, commonly known as alecrim-do-campo in Brazil, has boosted the interest of researchers to investigate its biological properties, especially its essential oil. Essential oils are easily degraded compounds and a proposal to preserve their properties is using nanotechnology. The incorporation of essential oils in nanostructures, such as nanoemulsions, helps to protect the active principle against actions of environmental degradation and can increase its solubility. **Objective:** Considering the increase in bacterial resistance, the importance of searching for new compounds with antibacterial potential and the numerous advantages of nanostructuring essential oils, this study aimed to evaluate the antibacterial activity and the chemical composition of *B. dracunculifolia* essential oil from three Brazilian regions and perform the nanostructuring of the essential oil through the production of nanoemulsions, to enhance the antibacterial action. **Methodology:** Three samples of essential oil of *B. dracunculifolia* were obtained: one sample from the city of Brasilia, Distrito Federal (Midwest region of Brazil), the second sample was obtained from the city of Estiva Gerbi, São Paulo (Southeastern region of Brazil), and the third sample was obtained in the city of Canelinha, Santa Catarina (Southern region of Brazil). The antibacterial activity of essential oils and nanoemulsions was evaluated against eight bacterial strains by determining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the Minimum Bactericidal Concentration (MBC). The essential oils were evaluated for the content of phenolic compounds (Folin-Denis) and antioxidant activity by reducing the radicals 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6 acid -sulfonic (ABTS). The analysis of essential oils by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) was also performed. Nanoemulsion formulations containing *B. dracunculifolia* essential oil were obtained by ultrasonication and were evaluated through droplet size (diameter), polydispersion index (PDI), Zeta potential, pH value, conductivity and SOR value (surfactant-to-oil ratio). **Results:** The three essential oils of *B. dracunculifolia* showed antimicrobial activity for both Gram-positive and Gram-negative bacteria tested, with MIC values from 0.03 to 0.15 mg/mL and MBC values from 0.05 to 0.30 mg/mL. The essential oil from the Midwest region of Brazil had higher and statistically significant antioxidant activity values compared to oils from the Southeast and South regions of Brazil, and essential oils from the Midwest and South regions of Brazil had higher and statistically significant values of phenolic compounds compared to oil from the Southeast region of Brazil. For the MIC values of nanoemulsions, these ranged from <0.03 to 0.08 mg/mL for Gram-positive bacteria and from <0.03 to 0.15 mg/mL for Gram-negative bacteria and for

CBM values ranged from 0.10 and 0.20 mg/mL for Gram-positives and all values were >0.20 mg/mL for Gram-negatives. Regarding nanoemulsions characterization, they had diameters between 13.14 ± 2.65 and 56.84 ± 0.80 nm, SOR values between 0.50 and 0.89, PDI values between 0.12 ± 0.03 and 0.35 ± 0.07 , Zeta potential between 4.14 ± 0.91 and 23.03 ± 2.15 mV, conductivity between 105.70 and 120.80 μ S/cm and pH between 6.73 and 7.55.

Conclusion: The essential oil from the Midwest region of Brazil was more effective on all tested bacterial strains, with lower and statistically significant MBC values and showed higher antioxidant capacity in relation to oils from the Southeast and South regions of Brazil. Due to the climatic characteristics of the Brazilian Cerrado region, marked by the dry winter, it is possible that the low relative humidity of the air and the lack of precipitation at the time of collection of leaves have favored the increase in the activity of essential oil for this species. Regarding nanoemulsions, the characterization tests showed suitable results for the type of formulated system, except for the Zeta potential values, a factor that may be related to the small size of the droplets produced. For the antibacterial evaluation, satisfactory results are observed with the nanoemulsions for six of the eight strains tested, in the Minimum Inhibitory Concentration tests, which indicates a bacteriostatic action improvement. The results of this study demonstrate that the essential oil of *B. dracunculifolia* is a natural compound with relevant antibacterial activity and the formulation of nanoemulsions can enhance its biological properties.

Keywords: *Baccharis dracunculifolia*, essential oil, bacterial resistance, MIC, MBC, nanoemulsion.

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1. Família *Asteraceae* e o Gênero *Baccharis*

Asteraceae ou *Compositae* é uma grande família de plantas, extremamente difundida, com mais de 23.600 espécies atualmente aceitas, contendo 1.620 gêneros e 13 subfamílias (KUETE, 2017), sendo a maior família do grupo das angiospermas (PRUSKI & ROBINSON, 2018). A família *Asteraceae* é especialmente diversificada nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, incluindo América do Norte, América do Sul (especialmente as regiões dos Andes e Brasil), África do Sul, Europa (principalmente a região do Mediterrâneo), Ásia Central e sudoeste da China (MUKHERJEE, 2019).

No Brasil, a família *Asteraceae* é representada por 290 gêneros e mais de 2000 espécies, distribuídas em todo o território nacional (BRASIL, 2020). Essas plantas podem ser encontradas como ervas anuais, bianuais ou perenes, arbustos, subarbustos, e menos frequentemente como árvores ou lianas (cipós e trepadeiras). Geralmente são terrestres, ocasionalmente são epífitas e raramente são aquáticas (PRUSKI & ROBINSON, 2018).

A característica geral mais óbvia e notável das *Asteraceae* são as flores agrupadas em inflorescências compactas (cabeças) que se assemelham superficialmente a flores individuais. Uma inflorescência dessa família pode ter mais de 1.000 flores individuais, e as cabeças podem ser agrupadas em arranjos secundários mais complexos, chamados capitulescências. As folhas são alternas, ocasionalmente opostas, raramente verticiladas, simples, sem estípulas, com margens inteiras, denteadas, lobadas ou fendidas. O caule geralmente é cilíndrico e raramente alado e os frutos são do tipo aquênio ou cipsela (JUDD et al., 2015; FRANGIOTE-PALLONE & SOUZA, 2014; ROQUE & BAUTISTA, 2008).

As espécies de *Asteraceae* têm sido cultivadas pela sua importância econômica, principalmente relacionada às culturas alimentícias de folhas, caules e sementes para extração de óleo vegetal (SIMPSON, 2009), bem como plantas ornamentais (BURLEC et al., 2017). Nas últimas décadas, diferentes espécies desta família foram estudadas devido à grande variedade e quantidade de compostos bioativos que sintetizam. Entre eles, os terpenoides e os flavonoides se destacam por suas atividades biológicas e potenciais benefícios à saúde (SÜLSEN et al. 2017).

Seu uso etnobotânico está focado principalmente nas espécies conhecidas popularmente como carquejas, vassourinhas e alecrins, as quais têm sido utilizadas para o tratamento de

enfermidades como agentes antimicrobianos, antiparasitários, anti-inflamatórios e antioxidantes (CAMPOS et al., 2016). As propriedades medicinais da família *Asteraceae* são reconhecidas mundialmente e as espécies dessa família estão incluídas em Farmacopeias de países como Alemanha, República Tcheca, França e Suíça (ACHIKA et al., 2014).

Dentre os gêneros encontrados nesta família, pode-se destacar o gênero *Baccharis*. O gênero *Baccharis* conta com mais de 500 espécies distribuídas pelo continente norte e sul-americano. As espécies deste gênero são encontradas principalmente nas regiões da Argentina, Brasil, Chile, Colômbia e México (ABAD, BEDOYA & BERMEJO, 2013).

No Brasil, o gênero *Baccharis* está representado por 179 espécies distribuídas principalmente nas regiões Sudeste e Sul (BRASIL, 2020), incluindo plantas herbáceas, perenes, arbustos, subarbustos, arbustos escandentes e pequenas árvores (SCHNEIDER, 2009). A fitoquímica do gênero *Baccharis* tem sido extensivamente estudada desde o início do século XX e mais de 150 compostos já foram isolados e identificados a partir deste gênero (KARAM et al., 2013).

Estudos realizados têm demonstrado o grande potencial biológico das plantas do gênero *Baccharis*. O óleo essencial de *Baccharis trimera* (conhecida popularmente como carqueja) demonstrou potencial antifúngico contra fungos filamentosos que causam onicomicose (CANESCHI et al., 2015), e o seu extrato demonstrou atividade anti-helmíntica contra vermes adultos e imaturos de *S. mansoni* (OLIVEIRA et al., 2014a). O extrato alcóolico de *Baccharis uncinella* (conhecida popularmente como arnica) apresentou efeitos anti-inflamatórios contra as reações inflamatórias induzidas pela fosfolipase A2, principalmente pela presença de triterpenoides (ZALEWSKI et al., 2011).

O extrato aquoso de *Baccharis anomala* (conhecida popularmente como cambará-de-cipó ou uva-do-mato) apresentou atividade antiviral pronunciada quando testado em cepas HSV-1 VR733 e 29-R resistentes ao Aciclovir (VENTURI et al., 2018). O óleo essencial de *Baccharis psiadioides* (conhecida popularmente como alecrim de folha larga ou vassoura) demonstrou atividade antibacteriana contra cepas resistentes de *E. faecalis* e reduziu a quantidade de biofilme aderida a superfícies abióticas, indicando seu papel como um promissor novo agente antimicrobiano natural (NEGREIROS et al., 2015). O óleo essencial de *Baccharis darwinii* (conhecida popularmente como chilca) demonstrou atividade inseticida promissora contra *Ceratitis capitata* (mosca de fruta do Mediterrâneo) e atividade repelente contra *Triatoma infestans* (inseto vetor da doença de Chagas conhecido popularmente como barbeiro). Demonstrou ainda forte atividade antifúngica contra leveduras e dermatófitos de relevância

clínica, incluindo alguns fungos como *Candida* spp. e *Trichophyton* spp. (KURDELAS et al., 2012).

1.2. *Baccharis dracunculifolia*

A espécie *Baccharis dracunculifolia* DC é popularmente conhecida como vassoura, vassourinha ou alecrim-do-campo. Apresenta-se como uma planta arbustiva, lenhosa, perene que ocorre que ocorre nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, nos países do Mercosul e nos vales elevados da Bolívia e é comum em campos abertos, pastagens abandonadas e áreas de sucessão. O arbusto cresce em média 2 a 3 metros (SANTOS et al., 2012) (Figura 1).



Figura 1. Arbusto de *Baccharis dracunculifolia* (fonte: SOUZA, 2018).

É uma espécie dioica, que se reproduz por sementes (aquênios), com caules bastante ramificados e densamente recobertos por tricomas (SANTOS et al., 2012). Apresenta plântulas com uma alta variabilidade fenotípica, que podem desempenhar um papel importante na capacidade desta espécie para colonizar áreas degradadas com solos pouco férteis (NEGREIROS et al., 2014).

A *B. dracunculifolia* se destaca pelas suas interações com insetos herbívoros e galhadores (FAGUNDES & FERNANDES, 2011), em especial as abelhas. A própolis verde é produzida a partir de fragmentos vegetativos da *B. dracunculifolia*, tais como brotos, primórdios foliares e folhas jovens por abelhas da espécie *Apis mellifera*. Esse material vegetal

é coletado e transportado até as colmeias, onde as abelhas adicionam cera e secreções glandulares ao material resinoso e balsâmico coletado produzindo, assim, a própolis (SFORCIN, et al., 2012).

A própolis oriunda da *B. dracunculifolia* tem despertado grande interesse da indústria farmacêutica por conter princípios ativos que apresentam importantes propriedades terapêuticas e farmacológicas (LEITE, TOUGUINHA & FRANÇA, 2018), como derivados prenilados do ácido fenilpropanóico, tais como a artemillin C e os ácidos cafeoilquínicos (COELHO, 2013), o que vem estimulando vigorosamente a sua produção (LEITE, TOUGUINHA & FRANÇA, 2018).

Assim como a própolis verde, o óleo essencial e os extratos obtidos da *B. dracunculifolia* têm sido estudados em virtude de suas composições químicas variadas. Estudos relataram a presença de compostos como *E*-nerolidol, espatulenol, óxido de cariofileno (SANTOS et al., 2012), limoneno (MIRANDA et al., 2016), β -pineno (CHAABAN et al. 2017), ácido cafeico, ácido p-cumárico (GUIMARÃES et al., 2012), entre outros.

Várias pesquisas relatam ainda as propriedades biológicas do óleo essencial e extratos das folhas de *B. dracunculifolia*. O óleo essencial de *B. dracunculifolia* apresentou atividade acaricida contra *Rhipicephalus microplus*, tornando-o candidato para combater infestações em rebanhos bovinos (LAGE et al., 2015). O óleo essencial demonstrou ainda potencial atividade larvicida contra larvas do mosquito *Culex quinquefasciatus* (ALVES et al., 2018). O extrato feito de folhas de *B. dracunculifolia* apresentou efeito anti-inflamatório em macrófagos por inibir a produção de citocinas (BACHIEGA et al., 2012).

Compostos isolados da fração hexânica bruta de *B. dracunculifolia* demonstraram atividade antifúngica contra isolados clínicos de *Paracoccidioides brasiliensis* onde o linolenato de metila apresentou melhor atividade antifúngica e resultou em alterações significativas na morfologia celular de *P. brasiliensis* (JOHANN et al., 2012). O extrato da folha de *B. dracunculifolia* apresentou significativa atividade antimicrobiana contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* e *Cryptococcus neoformans*, sendo este mais ativo que outros extratos vegetais de outras espécies da família *Asteraceae* (FABRI et al., 2011).

No estudo de OLIVEIRA et al. (2014b), a ingestão da solução oral de *B. dracunculifolia* reduziu os níveis de glicose no sangue em 25% (grupo controle: 99 mg/dL e grupo tratado: 68 mg/dL, $p < 0,05$). Ademais, chás, decocções e tinturas preparadas a partir da planta com flores são amplamente utilizados na medicina alternativa para tratar inflamações, distúrbios hepáticos e úlceras estomacais (PEREIRA et al., 2015).

1.3. Óleos Essenciais: aspectos históricos e usos industriais

Os primeiros registros de óleos essenciais vêm da Índia antiga, Pérsia e Egito. Na maioria das culturas antigas, plantas aromáticas ou seus produtos resinosos eram usados rotineiramente. Nessa época, Grécia e Roma faziam um intenso comércio de óleos e unguentos aromáticos com os países do Oriente. Muito provavelmente, esses produtos eram extratos de flores, raízes e folhas preparados em óleos fixos. Somente com o advento da era de ouro da cultura árabe foi desenvolvida a técnica de destilação de óleos essenciais (AUGUSTYN et al., 2019).

O conhecimento da destilação se espalhou para a Europa durante a Idade Média, e o isolamento de óleos essenciais por destilação foi descrito durante os séculos XI a XIII. Os óleos essenciais se tornaram uma especialidade das farmácias medievais. As teorias do médico e alquimista suíço Paracelso desempenharam um importante papel ao estimular médicos e farmacêuticos a buscar óleos essenciais de folhas, madeiras e raízes aromáticas (AUGUSTYN et al., 2019).

No Brasil, a indústria de óleos essenciais teve início no começo da década de 1920, quando se iniciou a extração do óleo essencial de pau rosa (*Aniba rosaeodora*) para substituir a produção franco-guianense que vinha diminuindo, em decorrência da intensa exploração da árvore. Mas foi só no final da década de 30, com o início da Segunda Guerra Mundial, que a indústria nacional passou a se desenvolver. Isto ocorreu porque a guerra afetou e desorganizou todo o comércio europeu, fazendo com que as empresas daquela região buscassem novos fornecedores (DOS SANTOS & PINTO, 2012).

Foi neste contexto que o Brasil surgiu como uma alternativa, pois possuía uma mão de obra barata e uma grande diversidade de riquezas naturais que atraía a atenção do mundo. A partir de então se intensificou a produção brasileira de óleos essenciais como: sassafrás, hortelã, laranja e eucalipto. Apesar da força inicial, o Brasil não se manteve no mercado internacional, dado o nível de concorrência frente aos países orientais (como Índia e Taiwan), produtores tradicionais de óleos essenciais e capazes de impor grandes volumes a preços baixos (ALMEIDA, 2016).

Até o início do século XX, os extratos de plantas ainda eram frequentemente rastreados pela indústria farmacêutica quanto a novos compostos ativos, que eram, portanto, purificados a partir das plantas nativas. Porém a partir deste período, a indústria farmacêutica começou a produzir esses produtos naturais sinteticamente e usá-los como modelos para gerar análogos estruturais como meio de obter novos fármacos com a eficácia desejada (MOSES &

GOOSSENS, 2017). Em meados do século XX, os óleos essenciais deixam de ter um papel importante na indústria farmacêutica e passam a ser cada vez mais empregados em perfumes, cosméticos e aromas alimentares, além de manter o seu uso na medicina alternativa (BILIA et al., 2014).

Atualmente, no segmento industrial, os óleos essenciais apresentam um amplo uso. Muitos óleos essenciais são usados nas indústrias de cosméticos e aromas, com consumo de 1000 toneladas por ano para os óleos mais apreciados, como óleo de limão e de eucalipto, com valor estimado de várias centenas de milhões de euros (REHMAN et al., 2016b). Os óleos essenciais são largamente incorporados em produtos cosméticos e perfumes, devido ao seu aroma agradável. E ainda são conservantes químicos naturais, além de agregar propriedades biológicas aos produtos, oferecendo benefícios para a pele e o corpo (SARKIC & STAPPEN, 2018).

O óleo essencial de hortelã-pimenta (*Mentha piperita*) é amplamente utilizado em produtos cosmeceuticos porque tem efeito refrescante devido ao mentol. Assim, este óleo é frequentemente usado em formulações de higiene, como enxaguantes bucais, dentifrícios, sabonetes, espumas banhos e cremes para os pés (REHMAN et al., 2016b). O óleo essencial de lavanda (*Lavandula angustifolia*) também é comumente usado como ingrediente de fragrância em sabonetes, cosméticos e perfumes. Outro óleo essencial bastante usado é o de camomila (*Matricaria chamomilla* L.), frequentemente incorporado em cremes e óleos para a pele, em enxaguatórios bucais, pastas de dente e xampus. O óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) é frequentemente utilizado como ingrediente de sais de banho, óleos de banho, géis e pomadas. Também é utilizado em xampus, pois tem efeito contra a caspa. O óleo de rosa (*Rosa x. damascene* Mill.) é amplamente utilizado como fragrância em diferentes tipos de produtos cosméticos (sabonetes, loções corporais, cremes faciais etc.) e também como agente aromatizante em produtos alimentícios, como geleia, sorvete, pudim e iogurte (SARKIC & STAPPEN, 2018).

Além da indústria de cosméticos e perfumaria, a indústria alimentícia também utiliza os óleos essenciais. Hoje, o maior consumidor mundial de óleos essenciais é a indústria de aromatizantes, especialmente para refrigerantes, que utilizam os óleos essenciais cítricos. A indústria de bebidas alcoólicas, do mesmo modo é uma consumidora substancial de óleos essenciais. Os óleos essenciais podem ser encontrados em licores, cervejas e bebidas típicas. Ainda, destacam-se o setor de fabricação de doces, laticínios, confeitos, sobremesas e panificação, para os quais os principais óleos essenciais utilizados são citrinos, canela, cravo, gengibre e anis (BASER & BUCHBAUER, 2015). Além disso, pesquisas vêm incorporando

óleos essenciais em revestimentos comestíveis, que visam proteger e preservar os alimentos, devido às suas atividades antimicrobianas e antioxidantes (ANTUNES et al., 2012).

Um uso atual muito abordado dos óleos essenciais é na Aromaterapia. Aromaterapia é uma das terapias complementares que usam óleos essenciais como os principais agentes terapêuticos no tratamento de várias doenças (ALI et al., 2015). Na aromaterapia, os óleos essenciais podem ser inalados, diluídos em água ou em outros óleos para aplicações diretas na pele. Inúmeros métodos e preparações aromaterapêuticas estão disponíveis, oferecendo uma ampla gama de opções de aplicação (MICHALAK, 2019).

Estudos demonstram que a aromaterapia pode melhorar as dificuldades na manutenção do sono e o despertar da manhã em idosos com demência (TAKEDA, WATANUKI & KOYAMA, 2017), auxiliar na redução de ansiedade e estabilização de pressão arterial em pacientes em Unidades de Terapia Intensiva (CHO et al., 2017), reduzir dor neuropática em pacientes diabéticos (METIN et al., 2017), melhorar sintomas de depressão (XIONG et al., 2018), entre outros. A grande evolução no que concerne à pesquisa científica acerca da veracidade da eficácia da Aromaterapia e de seu emprego racional e sustentável pode abrir grandes perspectivas não só para indústria, bem como para a área da saúde, do bem-estar e da qualidade de vida (BRITO et al., 2013).

Recentemente, os avanços das pesquisas em biotecnologia, as transformações recentes no perfil de consumidores (MIGUEL, 2011) e a necessidade da descoberta de novos medicamentos devido à prevalência de muitas doenças sem tratamentos adequados disponíveis (SIDDIQUI et al., 2014), trazem espaço para novas oportunidades e uma das inovações representativas desses processos está associada ao desenvolvimento de produtos derivados de compostos ativos naturais da biodiversidade (MIGUEL, 2011). Os óleos essenciais, que apresentam variados usos e benefícios, se tornam fortes candidatos neste campo (NAEEM et al., 2018).

Os óleos essenciais são produzidos por mais de 17.500 espécies de plantas de muitas famílias das angiospermas, por exemplo, *Lamiaceae*, *Rutaceae*, *Myrtaceae*, *Zingiberaceae* e *Asteraceae*, mas apenas cerca de 300 deles são comercializados (WIŃSKA et al., 2019). Nos vegetais, os óleos essenciais agem na atração de polinizadores, na proteção contra predadores e patógenos, evitam a perda de água, auxiliam no controle da temperatura e desempenham funções ecológicas, especialmente como inibidores de germinação. Essas características tornam as plantas que os produzem poderosas fontes de agentes biocidas, fato que é largamente estudado principalmente em vista das atividades bactericida, fungicida e inseticida (KNAAK & FIUZA, 2010). Muitos óleos essenciais apresentam efeito inseticida e afetam o sistema

nervoso octopaminérgico dos insetos. Nos testes toxicológicos, a ausência deste local-alvo em mamíferos e peixes torna os componentes dos óleos essenciais comparativamente não tóxicos e, portanto, estes podem ser usados como pesticidas menos perigosos a saúde humana (REHMAN et al., 2016b).

Várias plantas produtoras de óleo essencial já foram identificadas por suas propriedades de controle de pragas como: cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L.), capim-limão (*Cymbopogon winteriana*), vetiver (*Vetiveria zizanoides*), eucalipto (*Eucalyptus globulus*), alecrim (*Rosemarinus officinalis*) e tomilho (*Timo vulgaris*). As plantas hortelã (*Mentha spicata*) e manjerição (*Ocimum basilicum*) são eficazes em repelir moscas e hortelã-pimenta (*Mentha piperita*) repele mariposas, moscas, formigas e piolhos. Da mesma forma, também foram relatadas atividades inseticidas e antifúngicas eficazes de óleos essenciais de plantas aromáticas como: lavanda (*Lavandula angustifolia*), Artemísia (*Artemesia vulgaris*), gerânio (*Pelargonium roseum*), cedro-vermelho (*Juniperus virginiana*), citronela (*Cymbopogon nardus* e *Cymbopogon winterianus*) e malaleuca (*Melaleuca alternifolia*). Assim, muitas pragas podem ser controladas usando pesticidas ecológicos baseados em óleos essenciais de plantas (REHMAN et al., 2016b).

A produção mundial de óleos essenciais foi estimada em 2017 em mais de 150.000 toneladas avaliadas em cerca de 6 bilhões de dólares, o que representa o triplo em volume desde 1990 (45.000 toneladas). De acordo com várias análises econômicas, a projeção para 2020 seria de 370.000 toneladas, avaliadas em 10 bilhões em dólares (BARBIERI & BORSOTTO, 2018). Vale ressaltar ainda a importância do gerenciamento de recursos naturais, de modo que se adotem princípios de sustentabilidade, incluindo a questão ambiental no planejamento estratégico, dentro de um processo de melhoria contínua para a redução dos impactos ambientais ao uso destes recursos (BANKÚTI & BANKÚTI, 2014).

1.4. Definição, composição e biossíntese dos óleos essenciais e outros metabólitos secundários de plantas

O óleo essencial pode ser definido como um produto aromático, de composição química complexa, obtido por destilação a vapor, destilação a seco ou processo mecânico adequado sem aquecimento, a partir de uma matéria-prima vegetal definida botanicamente. Os óleos essenciais são solúveis em álcool, éter e óleos fixos, mas insolúveis em água. Geralmente são líquidos incolores à temperatura ambiente, apresentam índice de refração e atividade óptica muito alta, baixo peso molecular, alta volatilidade e uma fragrância característica da fonte da

qual se originam (BUTNARIU & SARAC, 2018; DHIFI et al. 2016; FERNÁNDEZ LOPÉZ & MARTOS, 2018).

Os óleos essenciais apresentam uma composição química complexa, no qual grande parte é formada por compostos voláteis como os terpenos e alguns compostos da via dos fenilpropanoides, como fenilpropenos, cumarinas e ácidos fenólicos (DHIFI et al., 2016; STEPHANE & JULES, 2020). Os óleos essenciais geralmente contem 20-60 componentes químicos, podendo passar de 100 compostos, sendo dois ou três componentes majoritários, por exemplo, no óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*) os componentes majoritários são carvacrol (30%) e timol (27%) (BILIA et al., 2014).

O óleo essencial obtido da espécie *B. dracunculifolia* apresenta composição bastante variada, no entanto vários trabalhos citam os terpenos E-nerolidol e espatulenol como componentes majoritários. PARREIRA et al. (2010) encontraram o E-nerolidol (33,51%) e o espatulenol (16,24%) como constituintes predominantes do óleo essencial de *B. dracunculifolia* coletado do município de Franca, SP. SANTOS et al. (2012) também identificaram no óleo essencial de *B. dracunculifolia* coletado do município de Botucatu, SP os sesquiterpenos E-nerolidol (33,81%) e espatulenol (18,96%). E no trabalho de SCHOSSLER et al. (2009), os compostos E-nerolidol (22,80%) e o monoterpeneo β -pineno (12,17%) foram os constituintes majoritários do óleo essencial de *B. dracunculifolia* coletado na cidade de Guaíba, RS.

Os óleos essenciais são produzidos pelas plantas através dos seus metabólitos secundários, sendo misturas heterogêneas que podem conter centenas de compostos químicos em diferentes concentrações (YAP et al., 2014; ZOUARI et al., 2012). Todos estes compostos são biossintetizados em estruturas especializadas, como osmóforos, tricomas glandulares, ductos e cavidades. Nessas estruturas, os óleos essenciais são ainda, acumulados e transferidos para a atmosfera por diferentes mecanismos de secreção (REHMAN et al., 2016a).

O metabolismo da planta pode ser subdividido em metabolismo primário (ou central) e metabolismo secundário (ou especializado) (POTT, OSORIO & VALLARINO, 2019). Os metabólitos primários como fitoesteróis, nucleotídeos, aminoácidos e ácidos orgânicos são encontrados em todas as plantas e desempenham papéis metabólicos essenciais para a sobrevivência (HUSSAIN et al. 2012). Já os metabólitos secundários podem ou não estar presentes nos vegetais dependendo das variáveis ecológicas. A planta produz estes compostos para a sua adaptação ao meio ambiente (FIOCRUZ, 2018), por meio de mecanismos de defesa contra patógenos e herbívoros, proteção contra radiação UV (SCHREINER et al. 2012), atração de insetos polinizadores e dispersão de sementes, entre outros (WINK, 2018).

A classificação dos metabólitos secundários de plantas inclui três grupos principais: 1) terpenos, 2) compostos fenólicos (taninos, ácidos fenólicos, cumarinas, estilbenos, lignanas, lignina e flavonoides) e 3) compostos contendo nitrogênio (alcaloides e glucosinolatos) (AGOSTINI-COSTA et al., 2012).

1.4.1 Biossíntese dos terpenos

Os terpenos e seus análogos oxigenados (terpenoides) representam uma classe bastante variada e extensa de compostos químicos. Eles são formados por várias unidades de isoprenos (C_5H_8) unidas e esses compostos são subdivididos em classes de acordo com o número de unidades de isopreno existentes. Os monoterpenos são isômeros compostos por duas unidades de isoprenos, isto é, possuem 10 átomos de carbono. Os sesquiterpenos são formados por três unidades de isoprenos, ou seja, 15 carbonos, enquanto, os diterpenos, os triterpenos e os tetraterpenos (carotenoides) são formados, respectivamente, por quatro, seis e oito unidades de isoprenos. Tanto os triterpenos como os tetraterpenos são compostos muito pesados (apresentam elevado peso molecular) e, por essa razão, não são encontrados em óleos essenciais (que contém somente substâncias voláteis), mas estão presentes nos extratos dos vegetais (MEDEIROS, 2014).

Os terpenos são formados por dois precursores iniciais: o isopentenil difosfato (IPP) e seu isômero dimetilalil difosfato (DMAPP). Ambos são produzidos pela via enzimática citosólica MVA (via do ácido mevalônico) ou pela via plastídica e enzimática 1-desoxi-d-xilulose-5-fosfato (DXP), igualmente chamada de via 2-C-metileritritol-4-fosfato (MEP) ou via não mevalônica (REHMAN et al., 2016b).

Estes precursores iniciais são utilizados como substratos para as reações catalisadas pelas prenilttransferases, enzimas responsáveis por condensarem números variáveis de unidades de isopentenil difosfato (IPP) e dimetilalil difosfato (DMAPP) e originarem o geranyl difosfato, precursor dos monoterpenos (C_{10}), farnesil difosfato, precursor de sesquiterpenos (C_{15}) e geranylgeranyl difosfato, precursor dos diterpenos. Para produzir triterpenos (C_{30}), duas unidades de farnesil (C_{15}) são combinadas, enquanto que para produzir tetraterpenos (C_{40}), duas unidades de geranylgeranyl (C_{20}) são combinadas. São responsáveis por essas conversões, uma grande família de enzimas, chamadas terpeno-sintases (TPS) (BUCHANAN, GRUISSEM & JONES, 2015).

Os terpenos são geralmente classificados de acordo com o número e organização estrutural das cinco unidades de isopreno de carbono envolvidas em sua síntese. Os terpenos

podem ainda gerar os terpenoides, isto é, terpenos com diferentes grupos funcionais e ter o grupo metil oxidado movido ou removido em várias posições (PERVEEN & AL-TAWHEEL, 2018). Essa classe de moléculas é a maior encontrada nas plantas, com mais de 30.000 membros descritos até o momento (ABDALLAH & QUAX, 2017).

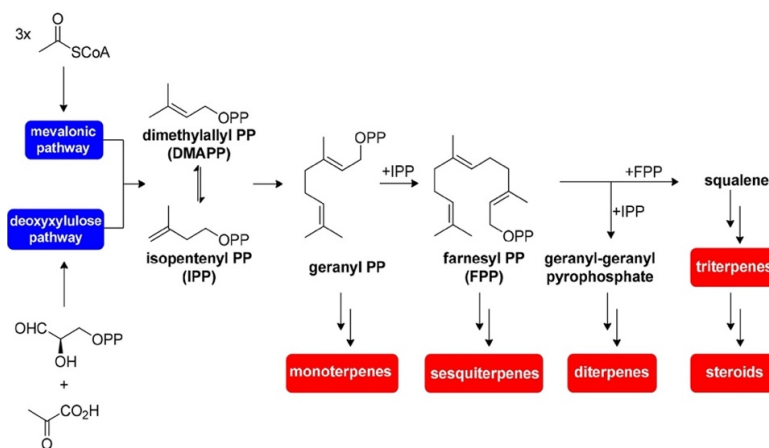


Figura 2. Esquema biossintético dos terpenos (fonte: BROCKSON, OLIVEIRA & DESIDERÁ, 2017).

A produção de terpenos é uma característica frequente, mas não universal de todas as plantas. A função dos terpenos na termotolerância das plantas tem sido amplamente estudada em vários experimentos. Plantas que secretam terpenos têm melhor capacidade de tolerar curtos períodos de alta temperatura de luz solar. Essas plantas também têm melhor tolerância contra muitas espécies reativas de oxigênio e ozônio, em comparação com plantas não emissoras de terpenos (REHMAN et al., 2016b).

Os monoterpênicos costumam ser compostos majoritários de óleos essenciais, podendo constituir 90% da composição destes. Os monoterpênicos são isômeros compostos por duas unidades de isoprenos, isto é, possuem 10 átomos de carbono e exibem uma grande variedade de estruturas químicas (Figuras 3, 4 e 5), incluindo hidrocarbonetos acíclicos (mircenos e ocimeno); hidrocarbonetos monocíclicos (limoneno, terpinenos, p-cimeno e felandrenos); hidrocarbonetos bicíclicos (pinenos, canfenos e sabinenos); álcoois acíclicos (geraniol, linalol, citronelol, lavandulol e nerol); álcoois monocíclicos (mentol, α -terpineol e carveol); álcoois bicíclicos (borneol, fenchol, crisantenol e thuyan-3-ol); aldeídos acíclicos (geranial, neral e citronelal); cetonas acíclicas (tegetona), cetonas monocíclicas (mentonas, carvona, pulegone e piperitone); cetonas bicíclicas (cânfora, fenchona e pinocarvone); ésteres acíclicos (linalil acetato ou propionato e acetato de citronelilo); ésteres monocíclicos (mentil ou acetato de α -terpinil); ésteres bicíclicos (acetato de isobornilo); éteres (1,8-cineol e mentofurano); peróxidos (ascaridol); e fenóis (timol, carvacrol) (BILIA et al., 2014).

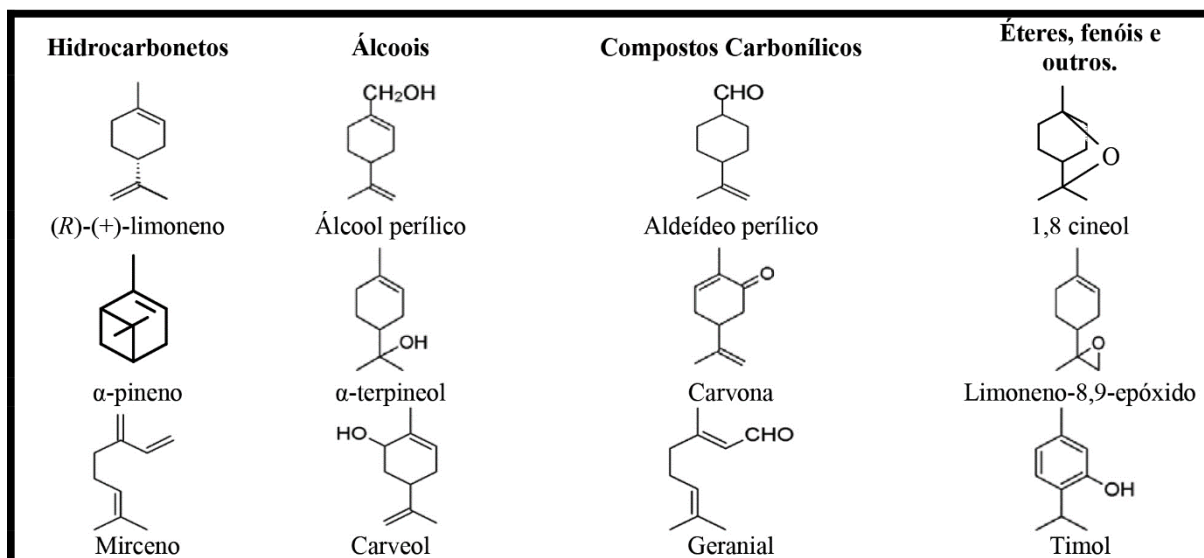


Figura 3. Diferentes estruturas químicas dos monoterpênos (fonte: FELIPE & BICAS, 2017).

Os sesquiterpenos são formados a partir da reunião de três unidades de isopreno (C15). A extensão da cadeia aumenta o número de ciclizações que permite uma grande variedade de estruturas (Figuras 4 e 5). Os sesquiterpenos incluem hidrocarbonetos (β -bisaboleno, cadinenos, β -cariofileno, farnesenos e zingibereno); álcoois (bisabolol, β -nerolidol, arneso, β -santalol e patchoulol); cetonas (germacrona, β -vetinona e turmerones); e epóxido (cariofileno óxido e epóxido de humuleno) (BILIA et al., 2014).

Estudos recentes revelaram os sesquiterpenos como os componentes majoritários do óleo essencial de *B. dracunculifolia*. No estudo de CAZELLA et al. (2019) foram identificados trinta constituintes no óleo essencial de *B. dracunculifolia* proveniente do município de Guaraniaçu, PR e suas principais classes foram: sesquiterpenos oxigenados (60,8%), hidrocarbonetos sesquiterpenos (22,9%) e hidrocarbonetos monoterpênos (9,6%). Os principais compostos encontrados foram os sesquiterpenos oxigenados espatulenol (27,4%) e trans-nerolidol (23,1%). Também foram relatados monoterpênos como β -pineno (5,6%) e hidrocarbonetos sesquiterpenos como trans-cariofileno (4,6%) e germacreno D (4,5%), entre outros compostos. No estudo de SALAZAR et al. (2018) os compostos mais abundantes do óleo essencial de *B. dracunculifolia* proveniente da Mata Atlântica no Estado do Paraná foram sesquiterpenos oxigenados (45,7%), seguidos por hidrocarbonetos sesquiterpenos (33,2%) e hidrocarbonetos monoterpênos (16,5%), sendo o principal constituinte o sesquiterpeno germacreno D (18,4%).

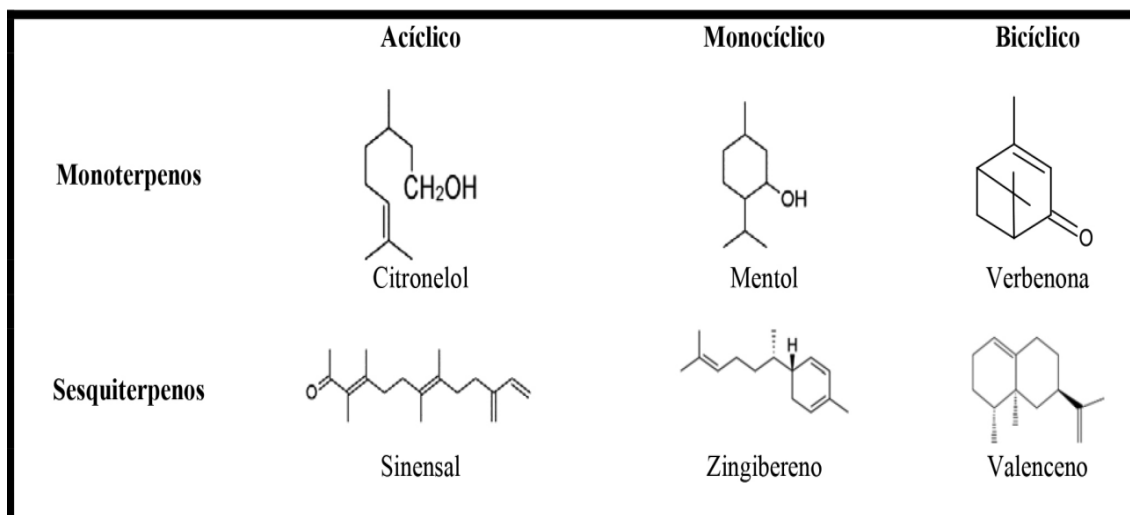


Figura 4. Estruturas químicas dos monoterpenos e sesquiterpenos acíclicos, monocíclicos e bicíclicos (fonte: FELIPE & BICAS, 2017).

No estudo de ALVES et al. (2018), a composição química do óleo essencial de *B. dracunculifolia* proveniente do município de Pitangui, MG consistiu em E-nerolidol (30,62%) como constituinte principal, seguido por germacreno D (9,41%), espatulenol (6,83%), β -cariofileno (5,77%) e limoneno (4,51%). Entre os constituintes do óleo essencial 78,57% foram hidrocarbonetos sesquiterpenos e sesquiterpenos oxigenados. No estudo de BARBOSA et al. (2015), óleo essencial de *B. dracunculifolia* proveniente do município de Botucatu, SP, apresentou a seguinte composição química: nerolidol (25,84%), espatulenol (13,14%), germacreno B (7,62%), germacreno D (7,09%), limoneno (6,93%), β -pineno (4,24%), δ -cadinol (4,11%), β -cariofileno (3,23%), α -pineno (2,53%), β -mirceno (1,22%) e isocariofileno (1,21%).

1.4.2. Biossíntese dos fenilpropanoides

Outras moléculas aromáticas presentes em menores concentrações que os terpenos nos óleos essenciais são os fenilpropanoides que compreendem compostos como: aldeídos (cinamaldeído); álcoois (álcool cinâmico); fenóis (chavicol e eugenol); derivados de metoxi (anetol, estragol e metileugenóis); e compostos metilenodioxí (apiole, miristicina e safrole) (Figura 5) (BILIA et al., 2014).

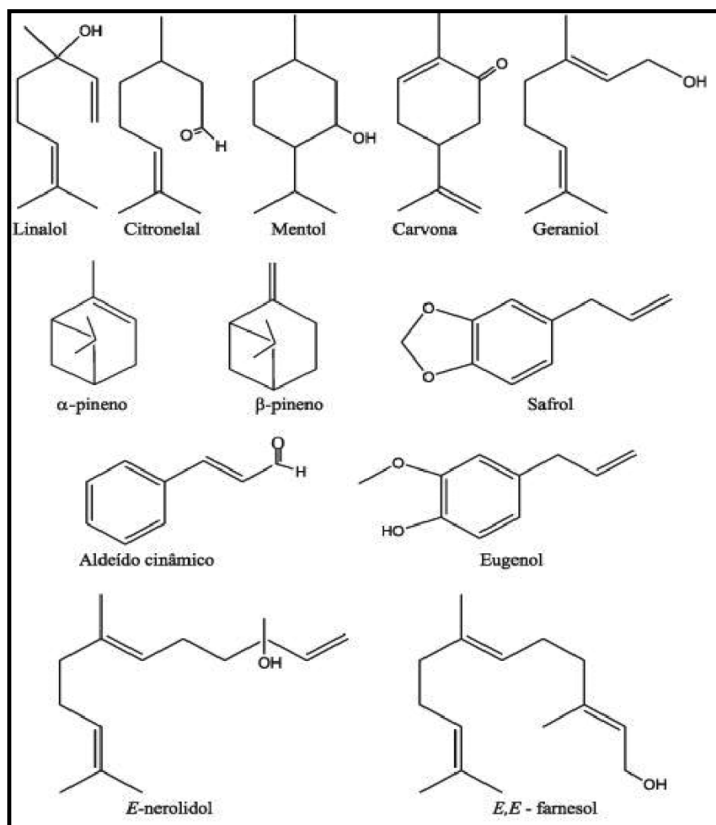


Figura 5. Estruturas químicas de monoterpenos, fenilpropanoides (aldeído cinâmico ou cinamaldeído, safrol e eugenol) e sesquiterpenos (E-nerolidol e E, E-farnesol) encontrados nos óleos essenciais (fonte: SIMAS et al., 2004).

No que se refere à via de biossíntese de fenilpropanoides (Figura 6), esta inclui a via central dos fenilpropanoides (GPP) e subsequentes vias ramificadas específicas, para a formação de flavonoides, estilbenos, ácidos fenólicos, monolignóis e cumarinas (DENG & LU, 2017). Na via geral (GPP), o composto precursor é a fenilalanina, originada da via do shiquimato, e o ponto de entrada que leva à biossíntese de fenilpropanoides (BUCHANAN, GRUISSEM & JONES, 2015; BIALA & JASIŃSKI, 2018).

Primeiramente, há uma desaminação da fenilalanina pela fenilalanina amônia-liase (PAL), formando o ácido cinâmico. Em seguida, ocorre a hidroxilação do ácido cinâmico para o 4-cumarato (ácido *p*-cumárico) pela enzima cinamato 4-hidroxilase (C4H) e por último a conversão do 4-cumarato (ácido *p*-cumárico) em 4-coumaroil-CoA (ou *p*-coumaroil-CoA) pela 4-coumarato-CoA ligase (4CL) (BUCHANAN, GRUISSEM & JONES, 2015; BIALA & JASIŃSKI, 2018). O *p*-coumaroil-CoA se torna o precursor para a síntese dos flavonoides, estilbenos, monolignóis e cumarinas (DENG & LU, 2017).

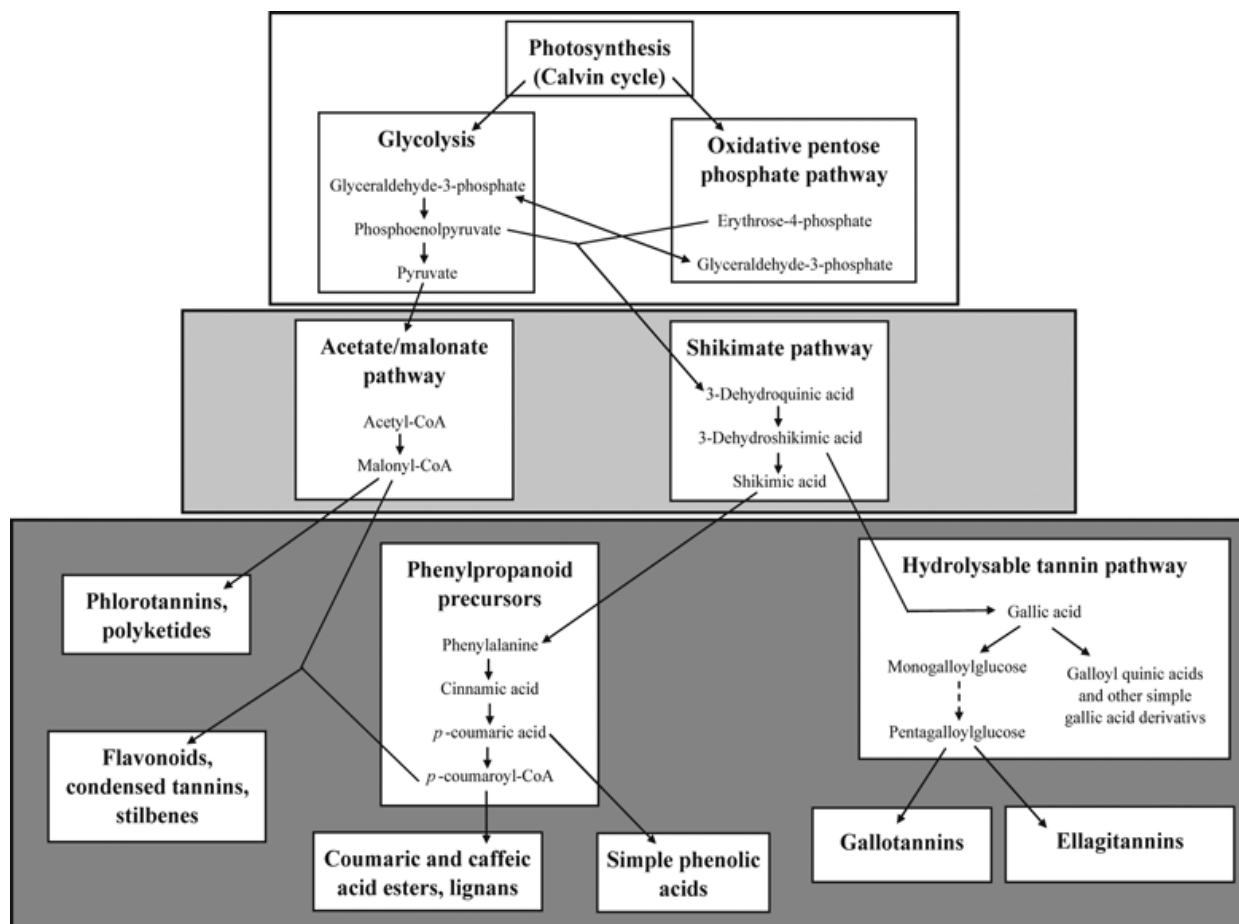


Figura 6. Esquema dos vários pontos de ramificação na biossíntese dos compostos fenólicos (SALMINEN & KARONEN, 2011).

1.4.2.1 Biossíntese dos flavonoides e estilbenos

Em relação à via dos flavonoides, esta se inicia com a condensação de uma molécula de *p*-coumaroil-CoA com três moléculas de malonil-CoA (originada do metabolismo primário), resultando em naringenina-chalcona, onde a reação é conduzida pela chalcona-sintase (CHS). Em seguida, a naringenina-chalcona é rapidamente isomerizada em naringenina pela chalcona isomerase (CHI) (SUN et al., 2015a), uma flavanona de estrutura central que pode sofrer várias modificações importantes por meio de enzimas e levar a uma grande diversidade estrutural de flavonoides, como flavonas, isoflavonas, isoflavanonas, pterocarpanos, di-hidroflavonóis, flavonóis, leucoantocianidinas (flavan-3,4-dióis), antocianinas, proantocianidinas, flobafenos e catequinas (flavan-3-ols) (BUCHANAN, GRUISSEM & JONES, 2015). Estes são classificados de acordo com o carbono do anel C que está ligado ao anel B e pelo grau de insaturação e oxidação do anel C (PANCHE, DIWAN & CHANDRA, 2016). Além disso, os flavan-3-ols, quando condensados, originam os taninos condensados, igualmente chamados de

proantocianidinas. Esses se diferenciam dos taninos hidrolisáveis, no qual a biossíntese se inicia a partir do ácido gálico (ONO et al., 2016).

Já os estilbenos, são originados através da condensação do *p*-cumaroil-CoA com três moléculas de malonil-CoA, pela ação da enzima estilbeno-sintase (STS) (JOO et al., 2014). Na presença de malonil-CoA e estilbeno sintase, o resveratrol é produzido através de uma reação aldol (HEALY et al., 2018). Uma vez sintetizada, a molécula de resveratrol pode ser subsequentemente modificada para produzir uma variedade de derivados químicos (HENDERSON, 2017). O resveratrol pode ser convertido em pterostilbeno pela *O*-metil transferase (CHAN et al., 2019), pode sofrer uma hidroxilação e originar o piceatanol (REZAIRE et al., 2014), sofrer uma glicolização e originar piceide, entre outros (HENDERSON, 2017).

1.4.2.2. Biossíntese dos monolignóis e fenilpropanos

A partir da via do monolignol, serão derivadas as ligninas (polímeros formados por acoplamento oxidativo fenólico de monômeros de álcool hidroxicinâmico) e as lignanas (dímeros formados por acoplamento oxidativo fenólico de monômeros de álcool coniferílico) (BEHR et al., 2018).

Em relação à lignina, primeiramente O *p*-coumaroil-CoA é convertido em *p*-coumaril aldeído pela O cinamoil-CoA: NADPH oxidoreductase (CCR). Este é então transformado pela álcool-cinâmico desidrogenase (CAD) no monolignol álcool *p*-cumarílico, precursor das ligninas H. Para a formação das demais ligninas, o O *p*-coumaroil-CoA é convertido pela hidroxicinamoil transferase (HCT) a *p*-coumaroil shiquimato, que após sucessivas reações originam os monolignóis álcool coniferil e o álcool sinapil, que serão precursores das ligninas G e S, respectivamente. Posteriormente, esses monolignóis são polimerizados pela peroxidase (POD) formando as unidades do polímero de lignina: *p*-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S) (PARIZOTTO et al., 2011; BUCHANAN, GRUISSEM & JONES, 2015).

A biossíntese das lignanas ocorre pela mesma via das ligninas, com diferenciações nas reações dos álcoois (TSOPMO, AWAH & KUETE, 2013), que serão dimerizados por enzimas oxidativas, como lacases e peroxidases (ZÁLEŠÁK, BON & POSPÍŠIL, 2019), formando assim compostos como o arilnaftaleno, ariltetralina, dibenzilbutano, dibenzilbutirolactona, tetra-hidrofurano e furofurano (MCCREATH, DELGODA, 2017).

Nesta via, são ainda formados os fenilpropenos. Os fenilpropenos se originam a partir do álcool cumarílico, coniferílico e sinapílico. Os álcoois são catalisados por uma

aciltransferase BAHD, que produzirá o éster acetílico correspondente. O éster acetílico é então reduzido por um membro da família IFR/PLR de redutases dependentes de NADPH para produzir eugenol, chavicol, isoeugenol ou t-anol. Estes são ainda modificados pelas enzimas do citocromo P450 e O-metiltransferases para uma variedade de estruturas (BUCHANAN, GRUISSEM & JONES, 2015).

1.4.2.3. Biossíntese das cumarinas

Existem quatro subtipos principais de cumarinas, classificadas de acordo com suas estruturas químicas: as cumarinas simples (compostos formados por dois anéis: benzeno e α -pirona), furanocumarinas (contém anel furano), piranocumarinas (contém anel pirano) e as cumarinas com substituintes no anel pirona (JAIN & JOSH, 2012; VENUGOPALA, RASHMI & ODHAV, 2013; KUBRAK, PODGÓRSKI & STOMPOR, 2017).

A biossíntese se inicia com a molécula de *p*-cumaroil-CoA sendo catalisada pela *p*-cumaroil-CoA 3 hidroxilase (C3'H), gerando cafeoil-CoA. O cafeoil-CoA então é metilado pela Cafeoil-CoA *O*-methyltransferase (CCoAOMT), originando o feruloil-CoA. O feruloil-CoA será catalisado pela feruloil-CoA 6'-hydroxylase (F6H), originando o 6-Hydroxyferuloyl-CoA. Por uma reação espontânea de isomerização, o 6-Hydroxyferuloyl-CoA é convertido à escopoletina, uma cumarina simples (BUCHANAN, GRUISSEM & JONES, 2015; SUN et al., 2015b).

O *p*-cumaroil-CoA pode ainda sofrer ação da *p*-coumaroil 2-hydroxylase (C2'H), originando 2,4-Dihydroxicinamoil-CoA, que espontaneamente forma umbeliferona, sendo também uma cumarina simples (HROBOŇOVÁ et al., 2013; BUCHANAN, GRUISSEM & JONES, 2015). A partir da umbeliferona, são sintetizadas uma série de cumarinas, como ostenol (furanocumarina), psoraleno (furanocumarina), esculetina (cumarinas simples) entre outras (BUCHANAN, GRUISSEM & JONES, 2015).

1.4.2.4. Biossíntese dos Ácidos Fenólicos

No que se referem aos ácidos fenólicos, estes são definidos quimicamente como ácidos carboxílicos derivados de esqueletos de ácido benzoico (ácidos hidroxibenzóicos) ou cinâmico (ácidos hidroxicinâmicos) (NEILSON & FERRUZZI, 2012; KUMAR & SHARMA, 2018). A adição de grupos hidroxila no anel fenil é a etapa principal envolvida na biossíntese de ácidos fenólicos (SWALLAH et al., 2020).

Primeiramente, há uma conversão da fenilalanina (originada do metabolismo primário) a ácido cinâmico pela fenilalanina amônia liase (PAL), que é convertido ao ácido *p*-cumárico pela cinamato 4-hidroxilase (C4H). A tirosina (originada do metabolismo primário) também pode formar o ácido *p*-cumárico, através da ação da enzima tirosina amônia-liase (TAL) (DOCIMO et al., 2013). O ácido *p*-cumárico é então convertido pela *p*-coumarato 3-hidroxilase (C3H) a ácido cafeico. O ácido cafeico é catalisado pela cafeoil-CoA *O*-metiltransferase (CCoAOMT), originando o ácido ferúlico (RODRIGUES et al., 2015; KIM & PARK, 2019).

O ácido cafeico pode ainda ser metilado o formar ácido isoferúlico, que é adicionalmente metilado para produzir ácido 3,4-dimetoxicinâmico. Este então é desmetilado, glicosilado e sofre um encurtamento da cadeia lateral para produzir ácido vanílico (KUNDU, 2017). O ácido ferúlico pode ainda ser convertido pela ferulato 5-hidroxilase (F5H) em ácido 5-hidroxiferúlico, e em seguida ser convertido pela catecol *O*-metiltransferase (COMT), para originar o ácido sinápico (BUCHANAN, GRUISSEM & JONES, 2015).

Além disso, o ácido cinâmico pode perder dois átomos de carbono, se transformando em ácido benzoico, o qual originará mais um grupo de ácidos fenólicos (KUMAR & GOEL, 2019), que incluem o ácido gálico, o ácido *p*-hidroxibenzóico, o ácido siríngico e o ácido protocatecuico (CHANDRASEKARA, 2019).

1.5. Fatores que influenciam na produção e composição dos óleos essenciais

A produção dos óleos essenciais pelas plantas, sua composição química e respectiva qualidade dependerão de diversos fatores que venham a interferir nas plantas de origem, sendo que estas estão sujeitas a uma ampla gama de estresses ambientais. Estes fatores ambientais podem ser categorizados em: estresses abióticos e estresses bióticos. Os estresses abióticos são definidos como os impactos negativos de fatores não-vivos nos organismos vivos em um ambiente específico como: luminosidade (BEN-ARI & LAVI, 2012; LIMA et al., 2017), temperatura (EBRAHIMI et al., 2011), clima e condições do solo (BASER & BUCHBAUER, 2015).

Os estresses bióticos são influências negativas causadas por outros organismos vivos e, na agricultura de produção, normalmente se referem a danos causados por insetos, nematóides parasitas de plantas, doenças ou ervas daninhas (O'SHAUGHNESSY & RUSH, 2014). Além disso, fatores como o armazenamento do material vegetal, métodos de extração e acondicionamento do óleo essencial também podem interferir na qualidade dos mesmos (TUREK & STINTZING, 2013; MOGHADDAM & MEHDIZADEH, 2017).

1.5.1. Influência dos fatores ambientais na produção e composição dos óleos essenciais e outros metabólitos secundários de plantas

A radiação solar tem uma grande influência no crescimento e metabolismo das plantas aromáticas e conseqüentemente na produção de óleos essenciais (SCHMIDT, 2010). A maior intensidade da luz geralmente favorece a produção dos metabólitos secundários e do óleo essencial através de ativação de enzimas fotossensíveis envolvidas em vias bioquímicas da planta (SOUZA et al., 2011). Porém, o contrário pode ocorrer em determinadas espécies de plantas, no qual as condições de sombra natural e ambiente protegido podem propiciar melhor biomassa da planta e conseqüentemente maior rendimento de óleo essencial (LUZ et al., 2014; OMOBOLANLE et al., 2013).

Da mesma forma, temperatura é um fator de interferência na produção de metabólitos secundários nas plantas (HASSIOTIS et al., 2014; SOUZA & SOUZA, 2017). O aumento da temperatura como um fator de estresse abiótico pode exercer uma influência considerável nos níveis de metabólitos secundários nas plantas, pois a planta irá produzir uma maior quantidade de determinados compostos, como ácidos fenólicos, para remover espécies reativas de oxigênio (EROs) antes que oxidem suas paredes e membranas celulares (SHAMLOO et al., 2017).

Para produção de óleos essenciais a temperatura é um importante fator ambiental que afeta a liberação de terpenos de plantas aromáticas. A liberação de óleos essenciais é mais intensa em climas quentes. Isso se deve ao fato de que as atividades da maioria das enzimas que catalisam a síntese de compostos orgânicos voláteis são estimuladas por aumento da temperatura. Assim, a produção de terpenos costuma ser maior nas plantas de regiões tropicais do que na maioria das plantas de ambiente frio ou temperado. Em plantas aromáticas, os terpenos atuam como uma forma natural de protetor solar, refletindo a luz solar e permitindo que a planta controle sua temperatura (REHMAN et al., 2016b).

O mesmo ocorre em períodos de seca, onde o estresse hídrico induz a produção de diferentes tipos de EROs, incluindo os radicais livres, como superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radicais hidroxila ($\bullet OH$), radical peridroxí (HO_2) e radicais ($RO\bullet$) (IMPA, NADARADJAN & JAGADISH, 2012). Como mecanismo de defesa, as plantas sintetizam metabólitos que incluem compostos antioxidantes fenólicos para lidar com danos oxidativos (GILL & TUTEJA, 2010). O efeito do clima seco na concentração de metabólitos secundários nos tecidos vegetais é muitas vezes, dependente do grau de estresse e do período em que ocorre, sendo que efeitos em curto

prazo parecem levar a um aumento da produção desses metabólitos, enquanto em longo prazo é observado um efeito oposto (SOUZA & SOUZA, 2017).

Climas úmidos também podem ser benéficos quando associados a temperaturas elevadas, produzindo condições favoráveis à proliferação de parasitas de insetos e de microrganismos. Isso faz com que as plantas aumentem a produção dos compostos encontrados nos óleos essenciais para sua própria proteção (BASER & BUCHBAUER, 2015).

Já em condições de frio, como no inverno, pode haver senescência e abscisão foliar nas plantas. Nesse período a espécie mantém poucas folhas, podendo inclusive vir à abscisão foliar completa no caso de ocorrência de geadas, o que diminui o rendimento do óleo essencial (PROCHNOW, 2015). Além disso, a redução dos teores de óleo essencial pode ocorrer pelo acionamento do mecanismo natural de fonte-dreno, no qual a planta degrada metabólitos secundários e direciona seus compostos químicos para a manutenção do metabolismo primário (TAIZ & ZEIGER, 2012), este que engloba reações e caminhos absolutamente vitais para a sobrevivência (POTT, OSORIO & VALLARINO, 2019).

O oposto pode ocorrer, quando há um aumento da biossíntese de metabólitos secundários regulada pelas baixas temperaturas, processo que se torna de grande importância na coordenação da planta na tolerância ao frio (XU et al., 2014). O estresse causado pelo frio pode promover a produção de compostos fenólicos e sua subsequente incorporação na parede celular da planta como suberina ou lignina, para um aumento da resistência (GRIFFITH & YAISH, 2004).

A idade e o estágio de desenvolvimento da planta também podem influenciar, não apenas na quantidade total de metabólitos secundários produzidos, mas na proporção relativa destes compostos (GOBBO-NETO & LOPES, 2007). No estágio vegetativo da planta (período entre germinação da semente e crescimento, antes da floração) (BENFEY & SCHERES, 2016, MATSOUKAS, 2014), a baixa quantidade de óleos essenciais pode ocorrer devido à inativação parcial das enzimas necessárias para a biossíntese desses compostos (DAGHBOUCHE et al., 2020), uma vez que neste período, algumas espécies de plantas acumulam recursos necessários para a floração e reprodução (HANGARTER, 2000).

No estágio de floração, fase reprodutiva da planta, pode haver um maior acúmulo da quantidade de compostos do óleo essencial (PADALIA et al., 2013; GRDC, 2015) e uma possível explicação é que nesta época, os metabólitos secundários auxiliam na atração de polinizadores/dispersores, o que levaria à uma produção mais intensa desses compostos (CASTELO, MENEZZI & RESCK, 2012). E ainda durante os processos de polinização, ocorre

aumento de metabólitos secundários como pigmentos coloridos e terpenoides com odores perfumados (WINK, 2018).

Já em um estágio tardio da colheita, com a planta amadurecida, pode-se obter um baixo rendimento dos óleos essenciais (SAEB & GHOLAMREZAE, 2012). O envelhecimento das folhas resulta em uma diminuição acentuada no conteúdo dos metabólitos secundários em comparação com as folhas jovens (GOBBO-NETO et al., 2017). As alterações metabólicas durante a senescência foliar incluem a hidrólise de macromoléculas, como proteínas, lipídios, ácidos nucleicos e pigmentos que foram acumulados durante a fase de crescimento (WATANABE et al., 2013; WOO et al., 2013). As plantas mais jovens produzem mais óleo essencial que as mais antigas, mas as plantas mais velhas são mais ricas em óleos mais resinosos e mais escuros, devido à evaporação contínua das frações mais leves do óleo essencial (AUGUSTYN et al., 2019).

Ademais, o material vegetal escolhido se torna um fator determinante da composição do óleo essencial (FIGUEIREDO, PEDRO & BARROSO, 2014). Os óleos essenciais podem ser extraídos de diversas partes da planta, como folhas (alecrim do campo, alecrim, orégano, tomilho, eucalipto, hortelã, sálvia, manjeriço, malaleuca, citronela, etc.), flores (lavanda, rosa, flor de laranjeira, camomila, cravo-da-índia, etc.), caules (canela, sândalo, pau-rosa), frutas (anis estrelado, frutas cítricas), sementes (coentro, alcarávia) e raízes (gingibre, alho, Angélica), onde cada parte pode apresentar diferentes concentrações (BUTNARIU & SARAC, 2018). As flores, folhas e caules são os órgãos vegetais onde, com maior incidência, se encontram estruturas secretoras (tricomos, canais ou bolsas), onde são produzidas misturas complexas de produtos naturais (FIGUEIREDO, PEDRO & BARROSO, 2014). Óleos essenciais extraídos de flores e caules geralmente contêm maiores quantidades de monoterpenos, enquanto o óleo essencial proveniente das folhas costuma ter maiores quantidades de sesquiterpenos (MOHAMMADHOSSEINI et al., 2013).

As condições do solo se tornam outro fator de interferência no rendimento do óleo essencial. Um solo adubado favorece a estrutura, aeração, armazenamento de água e drenagem interna do solo e o seu enriquecimento gradual com macro e micronutrientes (TRANI et al., 2013) responsáveis pelos processos de crescimento e desenvolvimento das plantas (TORRES-OLIVER et al., 2014), e conseqüentemente aumento da quantidade de óleos essenciais (MOREIRA & VIEIRA, 2015). Fertilizantes convencionais podem aumentar a produtividade, enquanto os fertilizantes biológicos alteram positivamente a composição do óleo essencial, ambos levando ao aumento da qualidade da colheita (BURDUCEA et al., 2018).

Em situações adversas, como em um solo encharcado, o oxigênio, componente do ar, não está presente. Dessa maneira, as raízes irão realizar a chamada respiração anaeróbia, que tem por consequência a redução do crescimento radicular e menos absorção de água e nutrientes (PES & ARENHARDT, 2015). Conjuntamente, o pH afeta a disponibilidade de nutrientes para a planta, onde variações no pH podem alterar a forma do nutriente no solo (NRCCA, 2016). A deficiência nutricional pode levar a um crescimento atrofiado, morte de tecido vegetal ou amarelecimento das folhas causadas por uma produção reduzida de clorofila, um pigmento necessário para a fotossíntese. A deficiência de nutrientes pode ainda ter um impacto significativo na agricultura, resultando em menor rendimento das culturas ou menor qualidade da planta (MORGAN & CONOLLY, 2013). O nitrogênio, por exemplo, é constituinte de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, clorofila e vários metabólitos primários e secundários, e sua deficiência pode causar redução no crescimento radicular, alteração na arquitetura radicular, biomassa vegetal reduzida e fotossíntese reduzida (KISHOREKUMAR et al., 2019).

Vale ressaltar também a importância do fator genético da planta sobre o óleo essencial e sua composição (LAMIEN MEDA et al., 2010). Os metabólitos secundários das plantas constituem um grande reservatório de diversidade química natural, o qual é constantemente gerado por meio de adaptações genéticas ao ambiente abiótico e biótico (CHEZEM & CLAY, 2016). A expressão gênica de resposta aos estresses é regulada em grande parte por fatores de transcrição, que por sua vez são submetidos a uma regulação muito complexa no nível da cromatina, RNA e proteína (BHARGAVA & SAWANT, 2012).

A interação entre as características genéticas da planta e das condições ambientais levam à formação de quimiotipos variados (JANNUZZI et al., 2011), isto é, plantas da mesma espécie com diferenças no metabolismo secundário, variando na estrutura química ou na sua composição (AQUINO, ARAÚJO & SILVEIRA, 2017). Estes fatores levam a uma variabilidade da composição química dos óleos essenciais e de uma subsequente variabilidade em sua qualidade (ZOUARI, 2013). Assim, o melhoramento genético seletivo pode ser uma estratégia eficaz para o desenvolvimento de populações que produzam altos teores de óleos essenciais (TSUSAKA et al., 2019).

1.5.2. Influência dos processos de extração no rendimento e composição dos óleos essenciais

Além dos fatores bióticos e abióticos nas plantas, fatores envolvidos no processamento do óleo essencial também podem interferir na qualidade dele. Métodos de extração inadequados podem causar danos ou alterar a composição química do óleo essencial, resultando na perda de bioatividade e características naturais. Em casos graves, pode ocorrer descoloração, odor desagradável e alterações físicas, como o aumento da viscosidade (TONGNUANCHAN & BENJAKUL, 2014).

Há uma variedade de técnicas para a obtenção do óleo essencial. Na hidrodestilação, a planta aromática permanece em contato com a água, podendo estar completamente imersa ou flutuando (BUSATO et al., 2014). Este método envolve aquecimento na presença de água a temperaturas mais altas que o ponto de ebulição, para produzir gases misturados que se expandem e percorrem por um condensador, onde são resfriados a menos de 30°C e condensados em duas fases líquidas separadas (sem mistura); uma fase sendo um hidrolato e a outra um óleo essencial. O aparato inclui também um decantador para coletar o condensado e separar os óleos essenciais da água, respectivamente (SADGROVE & JONES, 2015; RASSEM et al., 2016). O método pode apresentar algumas desvantagens, como falha em condensar o óleo essencial, ou se forem observados óleos condensados, eles poderão sofrer re-evaporação se a temperatura do hidrolato estiver muito alta. Assim, geralmente é uma prioridade regular a temperatura de ebulição, a fim de otimizar a hidrodestilação para maximizar o rendimento do óleo essencial (SADGROVE & JONES, 2015).

Na destilação a vapor, os materiais vegetais são carregados no alambique e submetidos ao vapor sem maceração em água. O vapor injetado passa através das plantas da base do alambique ao topo. A destilação a vapor é um método em que o vapor flui através do material. Esse vapor funciona como agentes que quebram os poros da matéria-prima e liberam o óleo essencial. O sistema produz uma mistura de vapor e óleo essencial. Esse vapor é então condensado e o óleo essencial é coletado (RASSEM et al., 2016). Este método apresenta algumas desvantagens, incluindo perdas de compostos voláteis, longos tempos de extração e alto consumo de energia (GAVAHIAN et al. 2015).

No método de extração por solvente, as amostras de plantas são misturadas com solventes, que serão extraídos por meio de aquecimento suave da mistura. O processo é seguido por filtração e evaporação dos solventes. O filtrado contém uma resina ou a mistura de cera, fragrância e óleo essencial. O álcool é combinado com a mistura filtrada para dissolver o óleo

essencial e, posteriormente, destilado a baixa temperatura. Durante o processo de destilação, o álcool absorve a fragrância e é evaporado enquanto o óleo essencial permanece no resíduo da panela (AZIZ et al., 2018). O efeito negativo na utilização de solventes orgânicos é a dificuldade de remoção de todo o solvente residual e a extração de compostos não voláteis. A remoção de todo o solvente necessita de muita energia e alto custo de investimentos em equipamentos, além disso, os solventes residuais podem provocar alterações químicas nos óleos e efeitos tóxicos nos consumidores (SARTOR, 2009).

No processo mecânico, geralmente conhecido como prensado a frio, o óleo essencial é produzido por um processo de prensagem, sem aquecimento. É aplicado principalmente a frutas cítricas e envolve a extração do óleo do pericarpo e subsequente separação por meios físicos (FARMACOPEIA EUROPEIA, 2013). Esse processo pode gerar produtos que não são totalmente voláteis, no entanto, eles são reconhecidos como óleos essenciais pelas Farmacopeias (RASSEM et al., 2016; FARMACOPEIA EUROPEIA, 2013).

Novas técnicas surgiram nos últimos anos no intuito de se obter produtos naturais com qualidade semelhantes ou melhores do que os métodos oficiais (RASSEM et al., 2016). A extração assistida por micro-ondas, por exemplo, é baseada no aquecimento do solvente através da absorção da energia de micro-ondas por moléculas polares, aumentando assim a penetração do solvente na matriz da amostra (GUARDIA & ARMENTA, 2011). A extração assistida por micro-ondas ocorre em três etapas: (1) separação do soluto da matriz da amostra sob alta pressão e temperatura, (2) difusão do solvente contra a matriz da amostra e (3) o soluto é liberado no solvente da matriz da amostra (KALEEM & AHMAD, 2018). Este tipo de extração apresenta algumas vantagens como menor tempo de extração, menor uso de solventes, maior taxa de extração dos óleos e menor custo, em relação aos métodos tradicionais de extração (DELAZAR et al., 2012).

Ademais, é importante que o óleo essencial mantenha sua estabilidade durante seu prazo de validade. Os produtos naturais costumam sofrer deterioração, principalmente durante o armazenamento, levando à perda de componentes ativos, produção de metabólitos sem atividade e, em casos extremos, produção de metabólitos tóxicos (THAKUR et al., 2011). No caso dos óleos essenciais, a estabilidade depende de fatores internos e externos que possam levar a alguma reação química. Os fatores internos incluem alterações na estrutura química e impurezas presentes no óleo essencial. Os fatores externos incluem presença de oxigênio, exposição à luz, umidade e temperatura (KHAYYAT & ROSELIN, 2018).

Estudos demonstram que o armazenamento do óleo essencial à temperatura ambiente pode diminuir os compostos terpênicos, enquanto em temperaturas baixas de armazenamento,

o óleo mantém a sua qualidade primária (NAJAFIAN, 2014) e a luz pode levar a um processo de fotodegradação, gerando compostos indesejáveis (BELTRAME et al., 2013). E a utilização de materiais inadequados para o acondicionamento do produto vegetal pode influenciar na qualidade do óleo, podendo inclusive, levar a uma redução no teor (SANTANA et al., 2016). A vida útil média dos óleos essenciais varia, dependendo do processo de fabricação e dos métodos de conservação. Se as condições ideais forem atendidas, a maioria dos óleos poderá ser armazenada por pelo menos três anos (BUTNARIU & SARA, 2018).

1.6. Atividade antioxidante dos óleos essenciais

Óleos essenciais de plantas como canela (*Cinnamomun zeylanicum*), noz-moscada (*Myristica fragrans*), cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L.), manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) e salsa (*Petroselinum crispum*) apresentam propriedades antioxidantes. O potencial antioxidante de um óleo essencial depende de sua composição. Está bem estabelecido que os compostos fenólicos e metabólitos secundários com ligações duplas conjugadas presentes nos óleos essenciais geralmente conferem propriedades antioxidantes. A atividade antioxidante dos óleos essenciais também se deve a certos álcoois, éteres, cetonas, aldeídos e monoterpenos como: linalol, geranial, citronelal, isomentona e mentona (DHIFI et al., 2016).

Os terpenoides fenólicos como timol e carvacrol são componentes majoritários dos óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare* L.) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.), o que explica porque esses óleos exibem forte atividade antioxidante (DHIFI et al., 2016). O carvacrol e seu isômero timol são alguns dos constituintes de óleos essenciais mais extensivamente estudados quanto as suas propriedades biológicas e os óleos essenciais ricos em carvacrol e timol são relatados como possuidores de notável atividade antimicrobiana (LA STORIA et al.; 2011; MAGI et al., 2015; MCETIN et al., 2011).

Uma proporção relativamente pequena de óleos essenciais é composta de fenilpropenos, e os fenilpropenos que foram mais completamente estudados são safrol, eugenol, isoeugenol, vanilina e cinamaldeído. O eugenol que exibe propriedades antioxidantes está presente nos óleos essenciais de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L.), noz-moscada (*Myristica fragrans*), canela (*Cinnamomun zeylanicum*), manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) e folhas de louro (*Laurus nobilis*) (CHOUHAN, SHARMA & GULERIA, 2017). Além das propriedades antioxidantes, o eugenol apresenta potencial ação bactericida e no estudo de HEER et al. (2017) o eugenol causou a deterioração da parede celular e lise de células de *Enterobacter aerogenes*.

1.7. Mecanismos de ação antibacteriana dos óleos essenciais

Diversas plantas apresentam óleos essenciais com atividade antibacteriana (ABAD et al., 2013; BACHIR & BENALI, 2012; BARBOSA et al., 2015; DIAO et al., 2013; FABRI et al., 2011; HU et al., 2019). A atividade antibacteriana do óleo essencial depende da sua composição química (NAZZARO et al., 2013), sendo que os mecanismos antimicrobianos ocorrem por meio de ação sinérgica dos compostos presentes (KALAIVANI et al., 2011). A ação dos óleos essenciais contra as bactérias em baixas concentrações podem ser apenas de inibição do crescimento bacteriano (efeito bacteriostático) ou pode ainda em altas concentrações ou através de ação mais eficiente, resultar em morte das células bacterianas (efeito bactericida) (CHOUHAN, SHARMA & GULERIA, 2017; FALEIRO, 2011).

A atividade antibacteriana dos óleos essenciais pode estar relacionada a um aumento na permeabilidade da membrana celular, levando ao vazamento de eletrólitos, além de perdas de proteínas e açúcares redutores. Essas mudanças resultam em lise celular e morte das bactérias viáveis (DIAO et al., 2013). Assim, em células procarióticas, o aumento na permeabilidade de membranas pela exposição a óleos essenciais está associado à perda de íons e a redução do potencial de membrana, ao colapso da bomba de prótons e ao esgotamento do ATP, que é pedido para o meio extracelular (SÁNCHEZ-GONZÁLEZ et al., 2011). Estes mecanismos ocorrem devido ao caráter hidrofóbico dos óleos essenciais, o que permite a sua penetração e distribuição na membrana celular e nas mitocôndrias, o que torna a estrutura celular instável e destrói sua integridade (WIŃSKA et al., 2019).

No estudo de BOUHDID et al. (2009), a investigação das alterações funcionais e morfológicas em bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* induzidas pelo óleo essencial de orégano (*Origanum compactum*) mostrou morte celular por mecanismos como: gradiente de potássio dissipado; membranas despolarizadas e permeabilizadas; respiração celular inibida e estrutura celular afetada apresentando material citoplasmático coagulado.

Além disso, os óleos essenciais podem ainda inibir a produção de toxinas bacterianas. A secreção de toxinas pode ser limitada por modificações na membrana bacteriana devido à fixação do óleo essencial que pode perturbar a bicamada fosfolipídica, com consequências no processo de transporte transmembranas, limitando assim a liberação de toxinas para o ambiente contíguo (FALEIRO, 2011). No estudo de DE SOUZA et al. (2010), avaliou-se a influência do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) na produção de enterotoxinas, permeabilidade da membrana e características da superfície celular de *S. aureus*. Observou-se a inibição de

produção de enterotoxinas estafilocócicas nas concentrações de óleo de 0,15 a 0,3 $\mu\text{L/mL}$ e em concentrações maiores de óleo (0,6 a 1,2 $\mu\text{L/mL}$) houve perda de potássio. A microscopia eletrônica das células tratadas com óleo essencial de orégano revelou a formação de buracos nas superfícies celulares e perda de material do citoplasma, indicando ruptura da membrana celular. Os autores concluíram que o óleo essencial de orégano poderia ser aplicado racionalmente em alimentos para inibir o crescimento de *S. aureus* e para suprimir a síntese de enterotoxinas estafilocócicas.

Ademais, a produção de ATP em procariontes ocorre tanto na parede celular quanto no citosol por glicólise. Assim, espera-se que alterações no equilíbrio intracelular e externo de ATP sejam afetadas devido à ação do óleo essencial na membrana celular. No estudo de PAUL (2011) as bactérias *Bacillus subtilis* tratadas com óleo essencial de cominho ajowan (*Trachyspermum ammi*) mostraram perda de ATP para o meio extracelular. A concentração de ATP extracelular nas células de *B. subtilis* não tratadas com óleo foi de 1,2 ng/mL , enquanto a concentração extracelular de ATP nas células de *B. subtilis* tratadas com óleo foi de 12,5 mg/mL , mostrando um significativo aumento da concentração de ATP extracelular causada pela exposição das bactérias ao óleo essencial.

Outro fator que pode sofrer interferência dos óleos essenciais é o pH. A homeostase do pH pode ser prejudicada pela ação dos óleos essenciais na membrana, esta que perde sua capacidade de bloquear prótons, acidificando o meio (FALEIRO, 2011). No estudo de SÁNCHEZ et al. (2010) a exposição de cepas de *Vibrio cholerae* ao extrato de manjerição (*Ocimum basilicum* L.) diminuiu o pH do citoplasma de 7,2 para 3,9. No estudo de LAMBERT et al. (2001) também foi relatada a diminuição do pH interno de cepas de *S. aureus* como resultado do tratamento destas com óleo essencial de orégano.

Os óleos essenciais podem ainda suprimir a comunicação entre bactérias dependente de quórum, conhecido como “Quorum Sensing” (BOUYAHYA et al., 2019). Então, os óleos essenciais suprimem o sistema de comunicação entre bactérias dependente da densidade populacional, no qual as bactérias produzem, detectam e respondem a compostos sinalizadores de baixa massa molecular (CAMPOS-GALVÃO, 2012). Este sistema de comunicação está envolvido na expressão de fatores de virulência e formação de biofilmes (DAMACENO & FARIAS, 2016). Contudo, a atividade anti “Quorum Sensing” de compostos de origem vegetal ainda é pouco compreendida, mas é provável que a atividade antibacteriana seja mediada por: (1) a inibição da síntese de AHL (homoserina lactona acilada), (2) a inibição do transporte e/ou secreção de AHL, (3) o sequestro de AHLs, (4) ação antagonista e (5) a inibição de alvos de ligação do receptor de AHL (NAZZARO, FRATIANNI & COPPOLA, 2013).

No estudo de BOUYAHYA et al. (2019), os autores concluíram que o óleo essencial de orégano (*Origanum compactum*) tem potente atividade antibacteriana contra *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*. Os mecanismos antibacterianos desse óleo estão relacionados à perda da integridade e ao aumento da permeabilidade da membrana celular, o que leva ao vazamento de materiais (DNA e RNA). Além disso, o óleo essencial de orégano apresentou atividade anti “Quorum Sensing”, pois inibiu a formação de biofilmes tanto de *B. subtilis* como de *E. coli*, apresentando maior atividade para *B. subtilis* em comparação com *E. coli*.

Compostos como os terpenos que são altamente presentes nos óleos essenciais, parecem inibir dois processos cruciais essenciais à sobrevivência microbiana, incluindo a captação de oxigênio e a fosforilação oxidativa. Microrganismos aeróbicos requerem oxigênio para produzir energia para o seu crescimento e baixas concentrações de oxigênio causam limitação nas taxas de respiração bacteriana. Enquanto isso, a fosforilação oxidativa é um processo bioquímico crucial responsável pela respiração celular que ocorre na membrana citoplasmática. Desta maneira, a interação com compostos terpênicos pode levar à alteração na respiração celular, que mais tarde causa desacoplamento da fosforilação oxidativa no microrganismo (MAHIZAN et al., 2019).

De acordo SÁNCHEZ-GONZÁLEZ et al. (2011), os terpenos, que são os compostos majoritários de óleos essenciais, têm a capacidade de penetrar a estrutura lipídica da membrana celular das bactérias, levando a desnaturação de proteínas e a destruição da membrana celular. LAMBERT et al. (2001) relataram que óleos essenciais contendo uma alta porcentagem de compostos fenólicos, como carvacrol (orégano), eugenol (cravo-da-índia) e timol (tomilho), apresentam forte propriedades antibacterianas contra patógenos de origem alimentar. Estes compostos são capazes de desintegrar a membrana externa de bactérias gram-negativas, liberando lipopolissacarídeos e aumentando a permeabilidade da membrana citoplasmática (LA STORIA et al.; 2011). Como é possível observar na Tabela 1 muitos estudos apresentam os danos causados à membrana celular como o principal mecanismo de ação bactericida proposto para diversos óleos essenciais.

A ação dos óleos essenciais pode variar de acordo com a bactéria, sendo que bactérias gram-positivas são mais suscetíveis aos óleos essenciais do que bactérias gram-negativas (WIŃSKA et al., 2019), fato este relacionado às variações estruturais das paredes celulares, onde a parede celular de bactérias gram-positivas permite que moléculas hidrofóbicas penetrem mais facilmente nas células e atuem tanto na parede celular quanto no citoplasma, enquanto a parede celular de bactérias Gram-negativas limita ou impede a penetração dos óleos essenciais na célula microbiana (NAZZARO et al., 2013). Os lipopolissacarídeos da parede celular de

bactérias Gram-negativas limitam a difusão de compostos hidrofóbicos, enquanto nas bactérias Gram-positivas a parede celular espessa de peptidoglicano facilita a infiltração de compostos hidrofóbicos dos óleos essenciais devido às extremidades lipofílicas do ácido teicóico (CHOUHAN, SHARMA & GULERIA, 2017).

Tabela 1. Mecanismo de ação antibacteriana proposto para diversos óleos essenciais.

Óleo essencial	Bactéria testada	Mecanismo de ação	Referência
Pimenta do reino preta (<i>Piper nigrum</i>)	<i>E. coli</i>	Perda de material intracelular	ZHANG et al. (2017)
Canela (<i>Cinnamomun zeylanicum</i>)	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>	Ruptura de membrana celular	ZHANG et al. (2016)
Funcho (<i>Foeniculum vulgare</i>)	<i>Shigella dysenteriae</i>	Perda da integridade da membrana celular	DIAO et al. (2014)
Orégano (<i>Origanum vulgare</i>)	<i>S. aureus</i>	Ruptura de membrana celular	DE SOUZA et al. (2010)
Orégano (<i>Origanum compactum</i>)	<i>E. coli</i> <i>B. subtilis</i>	Perda da integridade da membrana celular	BOUYAHYA et al. (2019)
Manjeriço (<i>Ocimum gratissimum</i>)	<i>Listeria innocua</i>	Aumento da permeabilidade da membrana celular	NGUEFACK et al. (2004)
Cominho ajowan (<i>Trachyspermum ammi</i>)	<i>B. subtilis</i>	Lise celular	PAUL (2011)
Menta (<i>Mentha longifolia</i>)	<i>E. coli</i> <i>Micrococcus luteus</i> <i>S. Typhimurium</i>	Dano à parede celular	HAFEDH et al. (2010)

Óleos essenciais contendo compostos fenólicos, como o carvacrol, o eugenol, o cinamaldeído e o timol têm atividades antibacterianas importantes contra um amplo espectro de bactérias: *E. coli*, *Salmonella enterica*, *Clostridium jejuni*, *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* e *Helicobacter pylori*. Outros compostos dos óleos essenciais também têm propriedades antibacterianas valiosas como os monoterpenos: geraniol, linalol, mentol, terpineol, tujanol, mircenol, citronelol, cânfora, carvona etc. Angélica, bergamota, capim-limão, tangerina, hortelã, cominho, aipo, citronela, coentro, eucalipto, gerânio, pinho, zimbro, lavanda, limão, laranja, hortelã-pimenta, alecrim, sálvia, orégano e tomilho estão entre os representantes das plantas com alguns desses compostos (DHIFI et al., 2016).

1.8. Determinação da atividade antibacteriana dos óleos essenciais

Os principais testes de atividade antibacteriana para óleos essenciais reportados na literatura são: disco difusão, determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e

determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) (CHOUHAN, SHARMA & GULERIA, 2017). De acordo com a CLSI (2015), a Concentração Inibitória Mínima (CIM) é definida como a menor concentração de um agente antimicrobiano que impede o crescimento de um microrganismo determinado por turbidez em testes de sensibilidade por diluição em caldo. E de acordo com a CLSI (1999) a Concentração Bactericida Mínima (CBM) é definida como a menor concentração de um agente antimicrobiano capaz de reduzir a contagem microbiana em 99,9%.

Assim vários estudos reportam na literatura a atividade antibacteriana de óleos essenciais principalmente através da determinação de CIM e CBM. Um estudo recente avaliou a atividade antimicrobiana de seis óleos essenciais provenientes de condimentos brasileiros comumente usados: manjeriço (*Ocimum basilicum* L.), alecrim (*Rosmarinus officinalis* L), manjerona (*Origanum majorana* L), hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L), tomilho (*Thymus vulgaris* L.) e erva-doce (*Pimpinella anisum* L) contra a bactéria *Clostridium perfringens*. O valor de CIM foi de 1,25 mg mL⁻¹ para o óleo essencial de tomilho e 5,0 mg mL⁻¹ para os óleos essenciais de manjerona e manjeriço. Os óleos essenciais de hortelã-pimenta, alecrim e anis apresentaram valores de CIM de 10 mg mL⁻¹ (RADAELLI et al., 2016).

No estudo de SI SAIDA et al. (2016) foi relatado que a atividade antibacteriana do óleo essencial dos frutos de *Eucalyptus globulus* mostrou inibição das bactérias *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* e *L. innocua*, com um valor de CIM de 3-4 mg mL⁻¹. O valor do efeito bactericida (CBM) variou entre 3,6 e 9,0 mg mL⁻¹, o que demonstrou que todos as bactérias testadas foram sensíveis ao óleo essencial de frutos de *Eucalyptus globulus*. Da mesma forma, foi relatado que o óleo essencial de hortelã bergamota (*Mentha citrata*) apresentou atividade antibacteriana contra as bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermiditis* e *Streptococcus mutans*) e Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Salmonella Typhimurium*), com um valor de CIM de 0,25-1,00 mg/mL (VERMA et al., 2016).

Em relação ao potencial antibacteriano do óleo essencial alecrim do campo (*B. dracunculifolia*), no estudo de SALAZAR et al. (2018) o valor de CIM foi de 0,1 mg/mL para *S. aureus* e de 8,1 mg/mL para *P. aeruginosa*. No estudo de BARBOSA et al. (2015) o óleo essencial de alecrim do campo proveniente do município de Botucatu, SP mostrou atividade contra cepas resistentes de *S. aureus*, sendo o valor de CIM de 6,7-8,4 mg/mL para *S. aureus* MRSA (cepas resistentes aos antimicrobianos beta-lactâmicos). E no estudo de CAZELLA et al. (2019) o óleo essencial de *B. dracunculifolia* proveniente do município de Guaraniaçu, PR apresentou CIM de 0,5-1,1 mg/mL para as bactérias Gram-positivas *S. aureus* e *B. cereus* e

CIM de 1,1-6,3 mg/mL para as bactérias Gram-negativas *P. aeruginosa* e *E. coli*. Os resultados dessas pesquisas revelaram que o óleo essencial alecrim do campo é um promissor produto natural com potencial antimicrobiano para uso contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

1.9. Resistência Bacteriana

Pode-se definir a resistência bacteriana como a capacidade da bactéria de interromper a ação de um determinado agente antibacteriano, resultando assim em tratamentos ineficazes, infecções persistentes e a possibilidade de transmitir essa característica a outras bactérias (WHO, 2020). A resistência bacteriana aos antimicrobianos é atualmente um dos problemas de saúde pública mais relevantes a nível global, dado que apresenta consequências clínicas e econômicas preocupantes. (LOUREIRO et al., 2016). O surgimento de resistência em microrganismos é um fenômeno natural, mas a seleção da resistência é impulsionada pela exposição aos antimicrobianos em cuidados de saúde, agricultura e meio ambiente (HOLMES et al., 2016).

A resistência bacteriana pode ser classificada como intrínseca e extrínseca. A resistência intrínseca ou inerente é uma característica presente no genoma de praticamente todas as bactérias de uma mesma espécie, não é adquirida por transferência horizontal de genes e é independente da existência de pressão seletiva por parte de um antimicrobiano (COX & WRIGHT, 2013). Esta resistência varia amplamente entre os diferentes patógenos e é determinada pela composição geral celular, onde os genes e seus níveis de expressão estabelecem uma suscetibilidade basal a um antibacteriano (DEAN, DE PASCALE & BENTON, 2018). Os mecanismos da resistência intrínseca são codificados pelo cromossomo e incluem bombas de efluxo não específicas (que provavelmente evoluíram como uma resposta geral a toxinas ambientais), enzimas de inativação de antimicrobianos e mecanismos que servem como barreiras de permeabilidade (PETERSON & KAUR, 2018).

A resistência extrínseca, ou adquirida, por sua vez, é o resultado de um processo evolutivo pelo qual os microrganismos se adaptam aos antimicrobianos por meio de vários mecanismos, incluindo alteração do alvo da droga por mutações e transferência horizontal de genes, conhecidos como genes de resistência (CLOECKAERT, ZYGMUNT & DOUBLET, 2017). Os genes de resistência adquiridos podem conferir resistência a uma classe inteira de agentes antimicrobianos, podem ser específicos para apenas um único membro de uma classe de antimicrobianos, ou ainda certos genes de resistência adquiridos podem conferir resistência

a membros de diferentes classes de agentes antimicrobianos (SCHWARZ, LOEFFLER & KADLEC, 2017).

A resistência extrínseca pode evoluir por meio de dois mecanismos básicos: transferência vertical e transferência horizontal. A transferência vertical ocorre pelo surgimento de mutações espontâneas no genoma bacteriano e sua subsequente transferência para os seus descendentes. Já a transferência horizontal ocorre pela aquisição de genes de resistência de outras bactérias, por meio de transdução, conjugação ou transformação (SOMMER et al., 2017).

A transdução é a transferência de genes bacterianos por um bacteriófago de uma célula para outra (MAHON & MANUSELIS, 2018). Um bacteriófago se liga a uma célula bacteriana receptora durante o desenvolvimento de um processo de infecção e injeta seu DNA viral, que é então integrado ao cromossomo bacteriano. A célula bacteriana eventualmente sofre lise, liberando um novo bacteriófago, que efetuará ação de vetor, infectando novas células bacterianas, podendo introduzir o DNA com os genes de resistência (LIMA et al., 2017; SOMMER et al., 2017).

Na conjugação, ocorre o contato físico de uma bactéria com outra, sendo que uma delas será a doadora, que transfere por fimbria ou pilus sexual, o material genético para a bactéria receptora. O ato de conjugar é geralmente atribuído aos plasmídeos, podendo estes possuir genes de resistência, passando para a bactéria receptora uma nova característica (LIMA et al., 2017).

A transformação é a captação e incorporação de DNA livre, resultado de lise de microrganismos, por uma célula bacteriana (LIMA et al. 2017; MAHON & MANUSELIS, 2018). Uma vez que o DNA tenha sido absorvido, ele pode ser incorporado ao genoma bacteriano por recombinação. Se o DNA for um plasmídeo circular e a célula receptora for compatível, o plasmídeo pode se replicar no citoplasma e ser transferido para células filhas durante a divisão celular (MAHON & MANUSELIS, 2018).

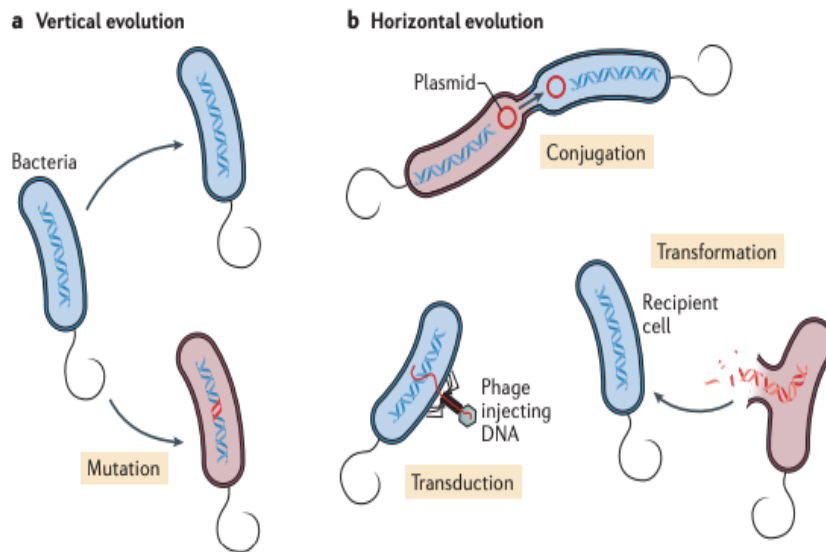


Figura 7. Representação dos mecanismos de transferência de genes de resistência adquiridos (fonte: SOMMER et al., 2017).

A resistência adquirida pode ser mediada por vários mecanismos, que se enquadram em três grupos principais: primeiro, aqueles que minimizam as concentrações intracelulares do antibiótico como resultado da baixa absorção pela bactéria ou pelo efluxo do antimicrobiano; segundo, aqueles que modificam o alvo do antimicrobiano por mutação genética ou modificação pós-traducional do alvo; e terceiro, aqueles que inativam o antimicrobiano por hidrólise ou modificação (BLAIR et al., 2014).

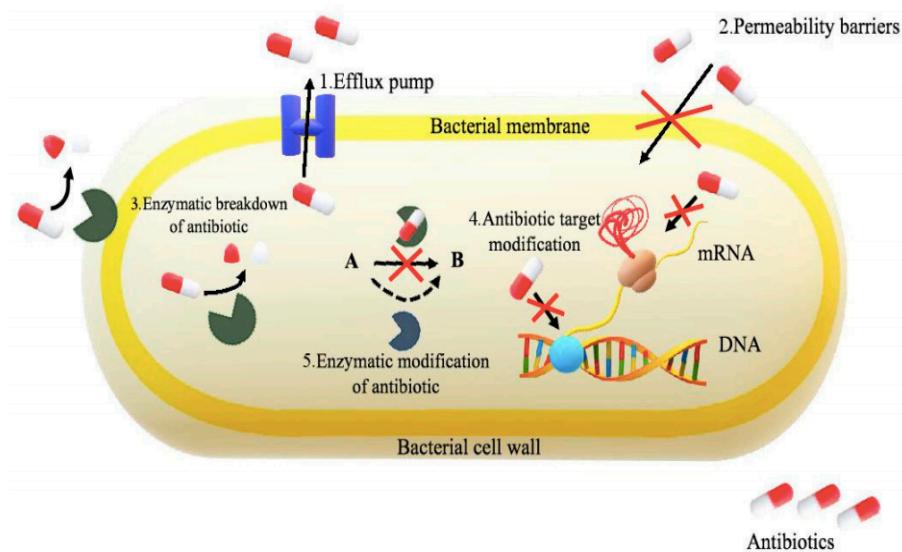


Figura 8. Mecanismos moleculares de resistência aos antimicrobianos (Fonte: PAUTER, SZULTKA-MŁYŃSKA & BUSZEWSKI, 2020).

1.9.1. Resistência bacteriana em bactérias Gram-positivas

Bactérias gram-positivas como *Staphylococcus aureus* apresentam notável capacidade de adquirir resistência a antimicrobianos (CARACIOLO et al., 2012). A resistência à penicilina em *S. aureus* foi detectada logo após o início de seu uso na década de 40. Essa resistência era mediada pela aquisição de genes que codificavam enzimas, inicialmente conhecidas como penicilinasas, e agora chamadas de β -lactamases. Em 1960, a meticilina foi lançada no mercado como alternativa terapêutica para as cepas produtoras de penicilinasas, uma vez que essa droga não sofre ação dessa enzima. Porém, já em 1961, cepas também resistentes à meticilina passaram a ser descritas e foram denominadas *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) (BRASIL, 2007). Estudos demonstram que o problema de resistência antimicrobiana em infecções hospitalares por MRSA é acompanhado por altas taxas de morbidade e mortalidade. A prevalência de infecções por MRSA pode variar de país para país e entre hospitais, e varia entre diferentes unidades do mesmo hospital (RAĠBETLI et al., 2016).

Além disso, isolados de *S. aureus* com resistência completa à vancomicina (VRSA) surgiram nos últimos anos. A resistência de *S. aureus* à vancomicina é mediada por um grupo de genes *van* (sendo o gene *vanA* o mais reportado), que são transferidos de enterococos resistentes à vancomicina. Desde que o primeiro isolado de VRSA foi reportado em Michigan, EUA, em 2002, outras 52 cepas VRSA carreadoras do gene *vanA* foram reportadas em países como Índia, Irã, Paquistão, Brasil e Portugal (CONG, YANG & RAO, 2019).

A resistência presente em cepas de *S. aureus* pode estar associada à alteração do alvo da droga que impede a ligação do inibidor, desrepressão de bombas de efluxo de resistência a múltiplas drogas codificadas cromossomicamente e múltiplas mutações graduais que alteram a estrutura e composição da parede celular e/ou membrana para reduzir o acesso do medicamento ao seu alvo (FOSTER, 2017).

Em relação ao gênero *Streptococcus*, este inclui microrganismos gram-positivos que podem causar infecções em humanos e em diversas espécies de animais, incluindo mamíferos e peixes. Diferentes espécies de estreptococos são frequentemente encontradas como bactérias comensais em mucosas. Ocasionalmente, os estreptococos estão presentes como microbiota cutânea transitória. Várias espécies exibem um alto potencial de virulência, mas mesmo as espécies estreptocócicas altamente patogênicas são frequentemente encontradas como cepas colonizadoras (SPELLERBERG & BRANDT, 2015).

Cepas de *Streptococcus* spp. podem apresentar resistência à macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas, através de mecanismos como: (1) modificação do local de ação, por meio

de mutação ribossômica nos resíduos cruciais para a ligação de macrolídeos, resultando em resistência cruzada a todos os macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B, conferindo o chamado fenótipo MLSb; (2) modificação da droga, inativando lincosamidas por meio de adenilação na posição 3 por uma 3-lincosamida-O-nucleotidiltransferase, codificada pelo gene *lnuB*, inativação de lincomicina, pela nucleotidiltransferase codificada pelo gene *lnuC* ou ainda inativação de macrolídeos causada por fosfotransferases codificadas pelas famílias de genes *mph*, com afinidade diferencial para os diferentes tipos de macrolídeos e lincosamidas de acordo com a variante do gene *mph* expresso; (3) proteção do local de ação, por meio de metilação da adenina na posição 2058, o que confere um fenótipo de resistência MLSb, sendo esta reação mediada pelas metilases codificadas pelo família de genes *erm* (metilação de ribossomo de eritromicina) e (4) bombas de efluxo, codificadas por genes *mef*, que conferem resistência aos macrolídeos, e genes *Isa*, que conferem resistência cruzada a lincosamidas, estreptogramina A e pleuromutilinas (HAENNI, LUPO & MADEC, 2018).

Acerca dos enterococos, estes são microrganismos ubíquos que podem estar presentes em diversos ambientes como solo, água, esgoto e plantas. Além disso, eles são conhecidos por pertencerem à microbiota comensal de humanos e animais (BEN BRAJĚK & SMAOUI, 2019). O gênero *Enterococcus* inclui alguns dos mais importantes organismos nosocomiais multirresistentes, e esses patógenos geralmente afetam pacientes que estão debilitados por outras doenças concomitantes e submetidos a hospitalização prolongada (ARIAS & MURRAY, 2012). Esses organismos desenvolveram resistência a praticamente todos os antimicrobianos atualmente usados na prática clínica, usando um número diversificado de estratégias genéticas (MILLER, MUNITA, ARIAS, 2014).

Devido a essa capacidade de recrutar determinantes de resistência a antibióticos, enterococos MDR (Multi Drug Resistant) exibem um amplo repertório de mecanismos de resistência a antibióticos, incluindo modificação de alvos de drogas, inativação de agentes terapêuticos, superexpressão de bombas de efluxo e uma resposta adaptativa de envelope celular sofisticada que promove a sobrevivência no hospedeiro humano e o ambiente nosocomial. Os enterococos MDR estão bem adaptados para sobreviver no trato gastrointestinal e podem se tornar a flora dominante sob pressão de antibióticos, predispondo o paciente gravemente doente e imunocomprometido a infecções invasivas (MILLER, MUNITA, ARIAS, 2014).

No que diz respeito aos *Bacillus* spp., estes são bactérias formadoras de esporos, presentes no solo, alimentos, larvas de insetos e em quase todas as superfícies e pele humana (GLASSET et al., 2018). Normalmente ocorrem como saprófitas, mas algumas espécies, como

B. cereus, são patogênicas em humanos e outros mamíferos (BLACKBURN & MCCLURE, 2009). A bactéria *B. cereus* pode estar relacionada a intoxicações alimentares e induzir infecções locais e sistêmicas. As principais condições descritas são septicemia, endoftalmite, pneumonia, endocardite, meningite e encefalite, principalmente em indivíduos imunossuprimidos como neonatos, resultando no óbito do paciente em cerca de 10% dos casos (GLASSET et al., 2018). Informações muito limitadas sobre os perfis de susceptibilidade antimicrobiana de *Bacillus spp.* estão disponíveis, mas de forma geral, a maioria dos isolados de *B. cereus* são resistentes a penicilinas e cefalosporinas como consequência da produção de β -lactamase (ADIMPONG et al., 2012).

1.9.2. Resistência bacteriana em bactérias Gram-negativas

A resistência em bactérias gram-negativas também tem se tornado preocupante. Estas bactérias usam amplamente os quatro mecanismos gerais de resistência, que incluem a limitação da absorção do medicamento, a modificação do alvo do medicamento, a inativação do medicamento e o efluxo ativo do medicamento, sendo ainda muito capazes de transferência horizontal de elementos de resistência (REYGAERT, 2017). Os mecanismos de resistência são originados por meio de mutações nas localizações gênicas de proteínas alvo ou aquisição de elementos genéticos móveis que transportam genes de resistência, como plasmídeos, integrons e transposons (ABATCHA et al., 2014).

A exemplo, bactérias da família *Enterobacteriaceae* são responsáveis por uma grande proporção de infecções graves e potencialmente fatais, e a resistência a múltiplos antibióticos nesses organismos é um problema crescente de saúde pública global (PARTRIDGE, 2015). A resistência de bactérias da família *Enterobacteriaceae* aos antibióticos, é cada vez mais dominada pela mobilização de genes únicos continuamente expressos que codificam enzimas modificadoras de drogas eficientes, como o gene *bla*, responsável pela codificação de enzimas β -lactamases, que hidrolisam o anel β -lactâmico, resultando em inativação dos antibióticos do grupo β -lactâmicos (PARTRIDGE, 2015; IREDELL, BROWN & TAGG, 2016).

Dessa forma, a resistência aos antibióticos aumentou muito em microrganismos como *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, que são importantes causadores de sepse grave. Algumas partes do mundo relatam que 60% ou mais de cepas isoladas de *E. coli* e *K. pneumoniae* são resistentes a importantes antibióticos β lactâmicos hospitalares, como cefalosporinas de terceira geração (por exemplo, cefotaxima), e que viajantes importam regularmente resistência para países com prevalência mais baixa (IREDELL, BROWN &

TAGG, 2016). Os mecanismos de resistência também podem ser encontrados no gênero *Salmonella*. A pressão seletiva devido ao uso indevido de agentes antimicrobianos em humanos e animais domésticos levou ao surgimento de cepas de *S. enterica* multirresistentes, incluindo resistência à quinolona, fluorquinolonas e cefalosporina de terceira geração, que são as drogas atualmente de escolha para o tratamento da salmonelose em casos severos (EL-TAYEB et al., 2017).

Em relação a *Pseudomonas aeruginosa*, este é um patógeno oportunista que normalmente habita o solo e as superfícies em ambientes aquosos. Sua adaptabilidade e alta resistência intrínseca aos antibióticos permitem que ele sobreviva em uma ampla variedade de outros ambientes naturais e artificiais, incluindo superfícies em instalações médicas. As infecções graves por *P. aeruginosa* são frequentemente nosocomiais e quase todas estão associadas a defesas do hospedeiro comprometidas. As infecções por *P. aeruginosa* são notoriamente difíceis de tratar devido à sua capacidade intrínseca de resistir a muitas classes de antibióticos, bem como sua capacidade de adquirir resistência. Todos os mecanismos conhecidos de resistência aos antibióticos podem ser exibidos por esta bactéria (intrínseco, adquirido e adaptativo) e às vezes, todos no mesmo isolado (GELLATLY & HANCOCK, 2013).

1.10. A busca por novos agentes antibacterianos

A descoberta de agentes antimicrobianos foi uma das maiores contribuições para a medicina no século XX. Quando introduzidos, eles tiveram um impacto imediato e dramático nos resultados de doenças infecciosas, tornando as infecções antes letais prontamente curáveis. Infelizmente, o surgimento de patógenos resistentes a antimicrobianos agora ameaça esses avanços. A resistência é uma séria ameaça à saúde que afeta o resultado clínico dos pacientes, bem como resulta em taxas mais altas de eventos adversos e custos de saúde (FILE JR, SRINIVASAN & BARTLETT, 2014).

Há relatos de níveis de resistência alarmantes em países de todos os níveis de rendimentos, o que dificulta o tratamento das doenças mais comuns e torna mais arriscado executar procedimentos médicos mais críticos. Atualmente, as doenças ocasionadas por resistências antimicrobianas já causam, pelo menos, 700.000 mortes por ano, em todo o mundo, um número que poderá aumentar para 10 milhões de mortes por ano, em todo o mundo até 2050, no cenário mais alarmante de total inativação. Aproximadamente 2,4 milhões de pessoas poderão morrer nos países de elevados rendimentos, entre 2015 e 2050, se não forem realizados

esforços sustentados para conter a resistência antimicrobiana. Ademais, até 2030, a resistência antimicrobiana pode levar à extrema pobreza até 24 milhões de pessoas (OMS, 2019).

Esta situação resulta em uma necessidade muito premente de descoberta de novos antimicrobianos e planos de tratamento, cujo desenvolvimento provavelmente será um desafio chave para a química medicinal do século XXI (O'CONNELL et al., 2013). Abordagens multidisciplinares são necessárias em todos os ambientes de saúde, bem como nos setores de meio ambiente e agricultura. Esforços abrangentes são fundamentais para a minimização do ritmo de resistência, mediante estudos de microrganismos emergentes, mecanismos de resistência e estratégias de novos agentes antibacterianos (ASLAM et al., 2018).

A escolha dos compostos químicos no início do processo de descoberta dos fármacos é de suma importância para o sucesso de novos medicamentos (WRIGHT, 2014). Os produtos de origem natural podem ser ótimas fontes para a triagem, uma vez que estes fornecem elementos únicos de diversidade molecular e funcionalidade biológica. Cientificamente, sabe-se que os produtos naturais têm maior número de centros quirais do que moléculas sintéticas, oferecem estereoespecificidade e variados quimiotipos, fatores importantes para a elaboração de medicamentos (LAHLOU, 2007).

Os produtos de origem natural podem ser utilizados como: 1) fonte direta de agentes terapêuticos (tanto como fármacos puros quanto fitomedicamentos); 2) fonte de matéria-prima para o desenvolvimento de drogas semissintéticas complexas; 3) protótipos para projeto de moléculas; 4) como marcadores taxonômicos para descoberta de novos fármacos. O mercado global anual de medicamentos vale cerca de 1,1 trilhão de dólares americanos, sendo 35% desses medicamentos originados direta ou indiretamente de produtos naturais, como plantas, microrganismos e animais (CALIXTO, 2019).

As plantas têm tradicionalmente fornecido uma fonte de novas entidades químicas e numerosos estudos clínicos comprovaram o valor terapêutico das moléculas de origem vegetal no organismo humano. Atualmente, os produtos derivados de plantas representam aproximadamente 25% dos medicamentos em uso clínico atual. Metabólitos secundários de plantas (fitoquímicos) demonstram seu potencial como antibacterianos quando usados isoladamente, como sinergistas ou potencializadores de outros agentes (ABREU, MCBAIN & SIMÕES, 2012).

Dentre os metabólitos secundários, os óleos essenciais derivados de plantas medicinais aromáticas (erva-doce, hortelã-pimenta, tomilho e lavanda) contendo misturas de substâncias voláteis, como monoterpenos, sesquiterpenos e/ou fenilpropanoides, foram relatados como ativos em bactérias gram-positivas e gram-negativas. A atividade antibacteriana promissora dos

óleos essenciais encorajou pesquisadores a usá-los junto com nanomateriais, óleos essenciais de outras plantas, componentes isolados e associados com antimicrobianos convencionais. Esta nova geração de fitofármacos pode expandir o desenvolvimento de novos regimes farmacológicos no combate à resistência aos antibióticos, se tornando futuramente terapias amplamente utilizadas no domínio médico moderno (SAVOIA, 2012; YAP et al., 2014).

1.11. Nanocompostos

A Nanotecnologia pode ser definida como o design, caracterização, produção e aplicação de estruturas, dispositivos e sistemas controlando a forma e o tamanho na escala nanométrica. A escala nanométrica é convencionalmente definida como 1 a 100 nm. Um nanômetro é um bilionésimo de um metro (10^{-9} m). A faixa de tamanho é normalmente definida como um mínimo de 1 nm para evitar que átomos únicos ou grupos muito pequenos de átomos sejam designados como nano-objetos (FILIPPONI & SUTHERLAND, 2013).

Os nanocompostos são sintetizados por diferentes métodos com base nos tipos e na natureza dos nanomateriais. Em um sentido amplo, "de cima para baixo" e "de baixo para cima" são os dois métodos principais para a síntese. No método de cima para baixo, os materiais são reduzidos a nanomateriais e, no caso do método de baixo para cima, os nanomateriais são sintetizados a partir do nível elementar. Os diferentes métodos que estão sendo usados para sintetizar nanomateriais são métodos de deposição de vapor químico, decomposição térmica, síntese hidrotérmica, método solvotérmico, ablação por laser pulsado, método de modelagem, método de combustão, síntese de micro-ondas, método de fase gasosa e método Sol-Gel convencional, entre outros (KHAN, 2020).

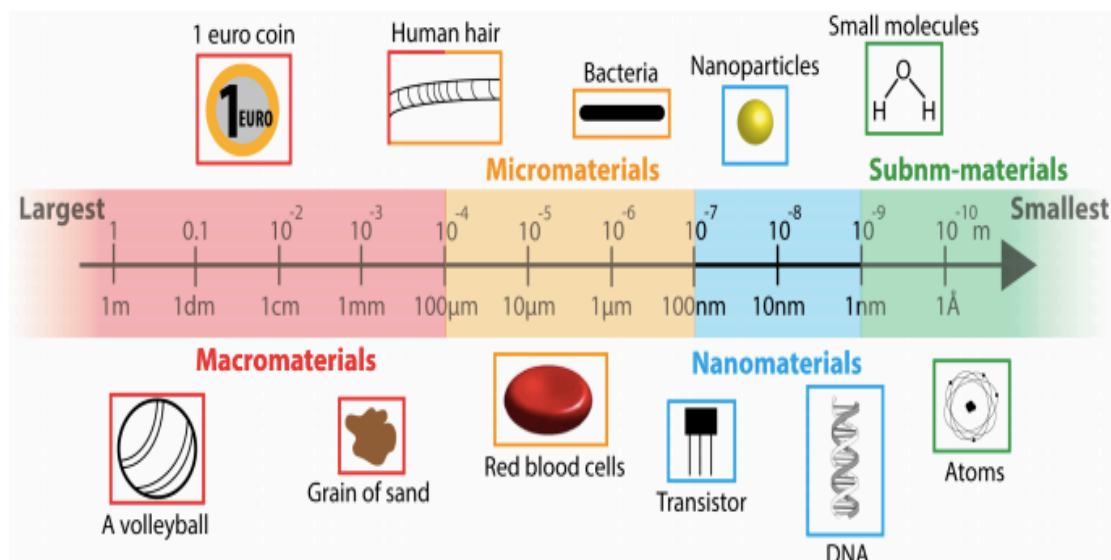


Figura 9. Escala comparativa do tamanho de determinados materiais. Os nanomateriais tem uma dimensão característica na faixa de tamanho de 1 a 100 nm (Fonte: WARD, 2014).

Os benefícios dessas novas estruturas nanométricas podem ser constatados pela rápida disseminação de resultados em áreas como aeronáutica, biotecnologia, materiais, nanoeletrônica, meio ambiente, saúde e segurança nacional. Atualmente, algumas das áreas de pesquisa em nanociência e nanotecnologia ativas incluem nanolitografia, nanodispositivos, nanorobótica, nanocomputadores, nanopós, catalisadores nanoestruturados, materiais nanoporosos, fabricação molecular, nanocamadas, nanotecnologia molecular e nanomedicina (MANSOORI, 2017).

Na área da saúde, os nanocompostos são considerados tecnologias promissoras. Devido ao seu tamanho diminuto, os nanomedicamentos podem facilmente atingir locais de difícil acesso com melhor solubilidade e biodisponibilidade e efeitos adversos reduzidos, melhorando também o transporte de determinados compostos para os locais-alvo. Portanto, a nanomedicina pode ser usada para alcançar o mesmo efeito terapêutico em doses menores do que suas contrapartes convencionais e pode oferecer soluções impressionantes para várias doenças potencialmente fatais. Embora certas questões tenham sido levantadas sobre os potenciais toxicidades dos nanocompostos, prevê-se que os avanços na nanomedicina fornecerão esclarecimentos para muitos dos problemas não resolvidos da medicina moderna (GAURAB et al., 2015).

A nanotecnologia também pode ajudar na incorporação de compostos de origem natural. A incorporação de nanopartículas em um sistema de entrega de produtos naturais pode ser um grande avanço nos esforços para o aumento dos efeitos terapêuticos. Recentemente, avanços foram feitos demonstrando que as nanopartículas podem aumentar significativamente a

biodisponibilidade de produtos naturais tanto *in vitro* quanto *in vivo* (WATKINS et al., 2015). O uso de nanocarreadores, como nanopartículas lipídicas e poliméricas, nanoemulsões, lipossomas e micelas poliméricas pode possuir inúmeras vantagens sobre as formulações como: liberação sustentada do elemento ativo; solubilização de moléculas lipofílicas; uso para diferentes vias de administração; proteção contra degradação química e enzimática de moléculas lábeis; redução da volatilização de óleos vegetais, redução de efeitos colaterais e redução de dosagem (BAJERSKI et al. 2016).

O uso desses nanosistemas se tornam uma ferramenta bastante atrativa e vantajosa para os óleos essenciais (BILIA et al., 2014). Existem alguns fatores que podem limitar a aplicação dos óleos essenciais como candidatos a tratamentos farmacoterapêuticos, o que demanda soluções de estudos de tecnologia farmacêutica. A exemplo, a exposição da pele diretamente aos óleos essenciais pode levar a reações alérgicas. Além disto, considerando que os principais constituintes dos óleos essenciais possuem cadeias de carbono insaturadas, sabe-se a sua susceptibilidade à oxidação mediada por luz ou calor. Os produtos de oxidação de terpenos, especialmente os sesquiterpenos oxidados com anéis lactônicos, terpenoides e outros metabólitos vegetais têm demonstrado alta atividade alergênica. A alta volatilidade dos componentes do óleo essencial também desencoraja seu uso livre, ou seja, sem um veículo farmacêutico. Além disso, a baixa solubilidade aquosa também limita as possíveis vias de administração. A baixa solubilidade aquosa dos óleos essenciais em fluidos biológicos impede sua absorção, levando a uma biodisponibilidade muito baixa. Assim, a tecnologia de nanoencapsulamento tem sido citada como uma alternativa para contornar esses problemas (SÃO PEDRO et al., 2013).

Dentre estas tecnologias, pode-se destacar as nanoemulsões, definidas como dispersões bifásicas de dois líquidos imiscíveis: gotas de água em óleo (A / A) ou óleo em água (O / A) estabilizadas por um surfactante anfifílico. Estes aparecem como dispersões ultrafinas cuja carga diferencial de droga; as propriedades viscoelásticas, bem como visuais, podem atender a uma ampla gama de funcionalidades, incluindo a administração de drogas. As nanoemulsões são: inerentemente resistentes aos mecanismos desestabilizadores normais persistentes nas emulsões; geralmente são transparentes, o que lhes confere um apelo cosmético e apresentam muitas oportunidades de aumentar a biodisponibilidade de medicamentos fortemente lipofílicos (SINGH et al., 2017).

Estudos já demonstraram os efeitos positivos da nanotecnologia aplicada aos óleos essenciais. A atividade antibacteriana do óleo essencial de *Thymus daenensis* contra *E. coli* aumentou consideravelmente quando ele foi convertido em uma nanoemulsão, o que foi

atribuído ao acesso mais fácil dos óleos essenciais às células bacterianas (MOGHIMI et al., 2016). O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* exerceu potente ação bactericida em peixes infectados experimentalmente com *P. aeruginosa*, principalmente quando nanoencapsulado. A nanoencapsulação foi capaz de melhorar a ação bactericida do óleo essencial, que apresentou 100% de efeito curativo, e pode ser considerada uma importante abordagem para prevenir e/ou tratar efetivamente animais infectados com este importante patógeno de peixes (SOUZA et al., 2017).

O desenvolvimento de nanoemulsões permitiu melhorar a estabilidade do óleo essencial de *P. anisum* aumentando sua eficácia contra pragas de grãos armazenados e contribuindo para reduzir o uso de inseticidas sintéticos prejudiciais (HASHEM et al., 2018). As nanopartículas revestidas com óleo essencial de *R. officinalis* inibiram fortemente a capacidade de aderência e o desenvolvimento de biofilme das cepas testadas de *C. albicans* e *C. tropicalis* à superfície do cateter (CHIFIRIUC et al., 2012).

O encapsulamento com nanolipossomas do óleo essencial de *Eucalyptus citriodora* aumentou a sua estabilidade e permitiu o seu uso a nível industrial (LIN et al., 2019). A nanoemulsão de contendo óleo essencial de *Nigella sativa* reduziu significativamente a viabilidade das células de câncer de mama MCF-7, indicando claramente a indução de apoptose nas células (PERIASAMY, ATHINARAYANAN & ALSHATWI, 2016). O encapsulamento do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* melhorou a biodisponibilidade dos compostos ativos e, em condições de laboratório, o produto desenvolvido mostrou-se uma alternativa não sintética promissora para o controle de larvas de *C. hominivorax* (SEUGLING et al., 2019).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho teve como objetivos avaliar a atividade antibacteriana e a composição química de óleos essenciais de *B. dracunculifolia* de três regiões do Brasil (Centro-oeste, Sul e Sudeste) e formular nanoemulsões contendo óleo essencial de alecrim do campo para potencialização da ação antibacteriana.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Testar a atividade antibacteriana de três amostras de óleos essenciais de *B. dracunculifolia* de diferentes regiões do Brasil: uma amostra da cidade de Brasília (Distrito Federal, região Centro-Oeste), outra amostra da cidade de Mogi Mirim (São Paulo, região Sudeste) e a terceira amostra da cidade de Canelinha (Santa Catarina, região Sul) pelo método de difusão em disco, pela Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM);
- Determinar a composição química dos três óleos essenciais por FTIR;
- Testar a atividade antioxidante dos três óleos essenciais;
- Produzir as nanoemulsões contendo óleo essencial de alecrim do campo e avaliar as suas características, por meio do tamanho das partículas (diâmetro), índice de polidispersão (PDI), potencial zeta, valor de pH e condutividade e valor de SOR (razão óleo-surfactante).
- Avaliar a atividade antibacteriana das nanoemulsões (método de difusão em disco, CIM e CBM).

3. METODOLOGIA

3.1. Amostras de óleos essenciais de *B. dracunculifolia*

Para a produção de óleo essencial da região Centro-Oeste do Brasil, folhas da planta de *B. dracunculifolia* foram coletadas em agosto de 2019 na Fazenda Água Limpa da Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brasil (15°56'00S e 47°56'00W). A planta foi identificada pelo botânico e professor Christopher William Fagg. As folhas foram lavadas em água corrente e depois foram secas à temperatura ambiente durante 7 dias. A amostra de óleo essencial foi obtida a partir de 50 g de folhas secas por hidrodestilação por 4 h em aparelho do tipo Clevenger e o processo foi repetido até conseguir o volume de óleo necessário para as análises. A segunda amostra de óleo essencial foi de uma marca comercial obtida no município de Estiva Gerbi, São Paulo, região Sudeste do Brasil (22°16'21S e 46° 56'46W). E a terceira amostra de óleo essencial foi uma marca comercial obtida em Canelinha, Santa Catarina, região Sul do Brasil (27°15'54S e 48°46'04W).

3.2. Determinação da atividade antibacteriana das três amostras de óleos essenciais de *B. dracunculifolia* e das nanoemulsões contendo óleo essencial de *B. dracunculifolia*

3.2.1. Preparo dos inóculos

Foram utilizadas as seguintes cepas bacterianas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (Gram-positivas) e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-140, *Escherichia coli* ATCC 25922 (Gram-negativas). O inóculo bacteriano foi preparado utilizando suspensão direta de crescimento microbiano em caldo Mueller Hinton com turbidez equivalente a 0,5 na escala McFarland ($1,0 \times 10^8$ UFC/mL), ajustado entre 0,08 e 0,10 na densidade óptica de 625 nm no espectrofotômetro.

3.2.2. Atividade antimicrobiana avaliada pelo método de difusão em disco

O método de ensaio de difusão em disco foi realizado utilizando protocolo recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012). Para realizar o ensaio de

difusão em disco, com o auxílio de swab estéril, o inóculo microbiano foi semeado na superfície de uma placa de ágar Müller-Hinton, até a obtenção de um esfregaço uniforme. Após a secagem do inóculo, foram aplicados discos de papel de filtro, com 6 mm de diâmetro, impregnados com 10 µL dos óleos essenciais de *B. dracunculifolia*. As leituras foram realizadas após 24 h de incubação a 37°C, por meio da medição dos halos de inibição do crescimento em milímetros de diâmetro. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados expressos em média ± desvio padrão.

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

As atividades de CIM e CBM dos óleos essenciais de *B. dracunculifolia* foram realizadas utilizando o método de microdiluição em caldo, conforme recomendação do *Clinical and Laboratories Standards Institute* (CLSI, 2015), com adaptações. O inóculo bacteriano com turbidez equivalente a 0,5 padrão McFarland ($1,0 \times 10^8$ UFC / mL) foi diluído em caldo Mueller Hinton na proporção de 1:150, resultando em uma concentração de $1,0 \times 10^6$ UFC/mL. Em seguida, as amostras de óleos essenciais de *B. dracunculifolia* foram diluídas em diferentes concentrações em caldo Mueller Hinton por diluição seriada (as concentrações variaram de 0,30 a 0,03 mg/mL). O volume de 0,1 mL das suspensões de inóculo a $1,0 \times 10^6$ UFC/mL foi distribuído em uma placa de microtitulação de 96 poços contendo 0,1 mL das diferentes concentrações de amostras de óleos essenciais de *B. dracunculifolia*, resultando em uma concentração bacteriana final de $5,0 \times 10^5$ UFC/mL.

Para determinar a CBM, alíquotas de 100 µL de cada amostra incubada foram semeadas em placas de ágar Mueller Hinton por 18–24 h, a 37°C. A CBM foi determinada como a menor concentração do óleo essencial que não permitiu o crescimento bacteriano visível no ágar. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada concentração testada dos óleos essenciais de *B. dracunculifolia*. Para determinar a CIM, o crescimento bacteriano foi avaliado pela adição de 20 µL de corante resazurina (0,01% p/v) a cada poço. A resazurina é um indicador de oxirredução usado para avaliar o crescimento celular. Possui uma cor azul não fluorescente que se torna rosa e fluorescente quando reduzida a resorufina por oxidorredutases dentro de células viáveis (SARKER et al., 2007). A menor concentração de óleo essencial que não apresentou alteração na cor foi definida como CIM, ou seja, os valores de CIM foram definidos como a menor concentração de um determinado óleo essencial de *B. dracunculifolia* que inibiu o crescimento bacteriano.

3.3. Análises de composição química das três amostras de óleos essenciais de *B. dracunculifolia*

3.3.1. Determinação de compostos fenólicos e atividade antioxidante

O conteúdo fenólico total foi determinado pelo método de Folin Denis (FOLIN & DENIS, 1912). A curva padrão de ácido gálico foi usada para calcular o conteúdo fenólico total nas amostras de óleos essenciais de *B. dracunculifolia*, e os resultados foram expressos em mg GAE/mL. A atividade antioxidante foi avaliada usando o ensaio de eliminação de radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) de acordo com KIM et al. (2002) e ensaio de eliminação de radicais livres ABTS (ácido 2,2-azinobis-3- etilbenzotiazolina-6-sulfônico) conforme descrito por RE et al. (1999). Os resultados foram expressos em mmol Trolox equivalentes por mL de amostra (mM TE/mL) e como % de inibição do radical DPPH. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados expressos em média \pm desvio padrão.

3.3.2. Análise de Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR das amostras de óleos essenciais de *B. dracunculifolia* foram analisados por meio do espectrofotômetro de infravermelho ThermoFisher Scientific. As amostras de óleos essenciais foram colocadas diretamente na superfície de par de placa retangular de cloreto de sódio à temperatura ambiente e as medidas foram realizadas na região do IV na faixa de 4000-600 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} . Os espectros foram analisados usando o software OMNIC.

3.4. Nanoemulsões contendo óleo essencial de *B. dracunculifolia*

3.4.1. Preparo das Nanoemulsões

Para o preparo das nanoemulsões, foi utilizado o óleo essencial de *B. dracunculifolia* (marca comercial obtida no município de Estiva Gerbi, São Paulo, região Sudeste do Brasil.) como fase oleosa, Tween 80 como surfactante e água ultrapura como fase aquosa. As concentrações do óleo essencial variaram entre 2,5 e 20% (m/m). O surfactante foi mantido em

uma concentração fixa de 20% e a água ultrapura foi ajustada para cada uma das nanoemulsões, como demonstra a Tabela 2.

Tabela 2. Composição das nanoemulsões contendo óleo essencial de *B. dracunculifolia*.

Composição (%)	Nanoemulsões					
	1	2	3	4	5	6
Água	60	65	70	72,5	75	77,5
Óleo	20	15	10	7,5	5	2,5
Tensoativo	20	20	20	20	20	20

As nanoemulsões foram produzidas por meio de um processador ultrassônico (Vibra-Cell VC 750 - Sonics & Materials, Inc., Newtown, EUA). As formulações foram sonicadas por 10 min, onde, cada ciclo consistiu em pulsos de 30 s ligados e de 30 s desligados, como descrito por PRAKASH et al. (2019). Para controle do calor gerado durante o processo de sonicação, foi colocado um recipiente com gelo sob o frasco com as amostras. Após o preparo, as nanoemulsões foram mantidas sob refrigeração (Figura 1).

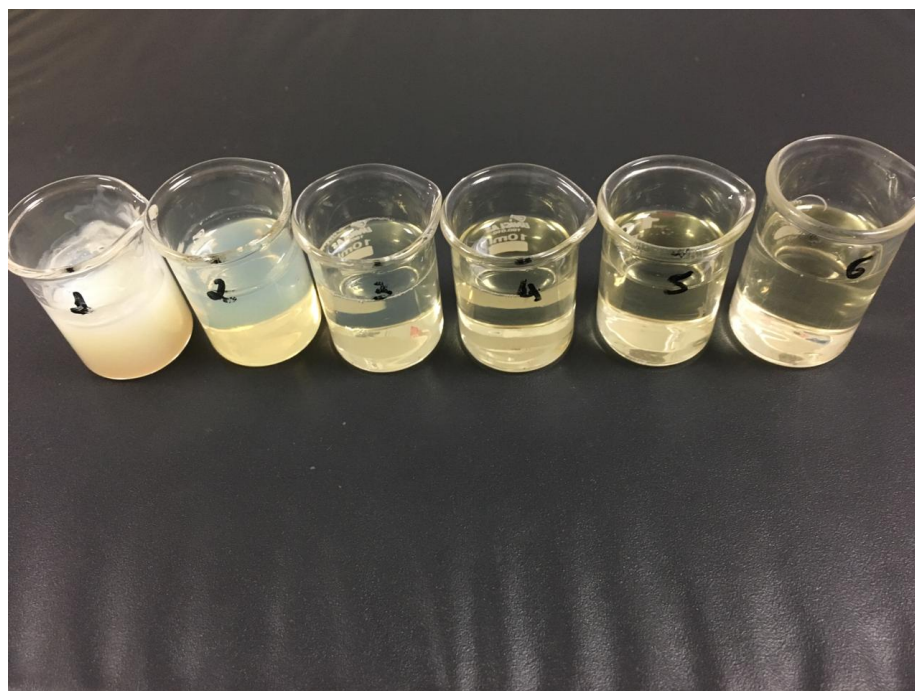


Figura 10. Nanoemulsões de óleo essencial de *B. dracunculifolia* nas concentrações de óleo essencial em 20% (1), 15% (2), 10% (3), 7,5% (4), 5% (3) e 2,5% (6).

3.4.2. Caracterização das nanoemulsões

O tamanho das gotículas (diâmetro), o índice de polidispersão (PDI) e o potencial zeta foram mensurados utilizando o aparelho Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical, EUA). As análises foram feitas com 1 mL de cada nanoemulsão logo após o preparo. O valor de pH foi mensurado por pHmetro digital, previamente calibrado com solução de calibração e a condutividade foi mensurada por condutivímetro digital, ambas as medições feitas imergindo a ponta dos eletrodos no recipiente com as nanoemulsões, em temperatura ambiente (27°C). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3.5. Análise Estatística

Os dados foram analisados com auxílio do software STATISTICA®, versão 10.0. A análise de variância (ANOVA) foi realizada para detectar diferenças significativas entre as médias e, quando as diferenças foram estatisticamente significativas, o teste de Tukey foi aplicado para as comparações das médias.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *B. dracunculifolia*

A Tabela 3 apresenta os resultados para a atividade antibacteriana das três amostras de óleos essenciais de *B. dracunculifolia* avaliadas pelo método de difusão em disco em ágar. Os óleos essenciais apresentaram atividade antibacteriana para *S. aureus*, *B. cereus*, *S. mutans* e *E. faecalis* (halos de inibição de 19,4-33,0 mm), porém, não houve atividade antimicrobiana para as bactérias Gram-negativas testadas.

Normalmente, as bactérias Gram-positivas são mais suscetíveis aos óleos essenciais do que as bactérias Gram-negativas. As bactérias Gram-negativas possuem uma membrana externa composta por lipopolissacarídeos na parede bacteriana, que limita a penetração e o acúmulo de óleo essencial, enquanto nas bactérias Gram-positivas, a camada espessa de peptidoglicano na parede celular facilita a infiltração de compostos hidrofóbicos de óleos essenciais, devido às extremidades lipofílicas do ácido teicóico (CHOUHAN et al., 2017; WIŃSKA et al., 2019). Outro ponto importante a ser considerado é que os óleos essenciais apresentam dificuldade de

difusão homogênea no meio de cultura devido à sua natureza hidrofóbica, tornando o método da difusão em disco questionável na determinação de sua atividade antimicrobiana (INOUE et al., 2006).

Tabela 3. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *B. dracunculifolia* avaliada pelo método de difusão em disco.

Cepas	Diâmetros da zona de inibição (mm)		
	Óleo da região	Óleo da região	Óleo da região
	Centro-oeste	Sudeste	Sul
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	24,0 ± 0,20 ^a	19,4 ± 0,57 ^b	25,0 ± 0,01 ^a
<i>B. cereus</i> ATCC 14579	32,0 ± 0,15 ^a	21,0 ± 0,11 ^b	33,0 ± 2,64 ^a
<i>S. mutans</i> ATCC 25175	21,7 ± 0,43 ^a	23,0 ± 0,10 ^a	26,7 ± 0,88 ^b
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	22,3 ± 0,60 ^a	20,7 ± 0,57 ^a	23,0 ± 0,64 ^a
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	N	N	N
<i>K. pneumoniae</i> ATCC BAA-1706	N	N	N
<i>S. enterica</i> ATCC 14028	N	N	N
<i>E. coli</i> ATCC 25922	N	N	N

N = Sem inibição do crescimento. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão de três repetições. Letras diferentes dentro da mesma linha significam diferenças significativas em $p < 0,05$ de acordo com o teste de Tukey no nível de confiança de 95%

Os valores de CIM e CBM das cepas bacterianas estão apresentados na Tabela 4 e os três óleos essenciais de *B. dracunculifolia* mostraram atividade antimicrobiana para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas testadas. O óleo da região Centro-Oeste do Brasil foi mais eficaz em todas as cepas bacterianas testadas, com valores de CBM menores e estatisticamente significantes em relação aos óleos das regiões Sudeste e Sul do Brasil. Já o óleo da região Sul do Brasil apresentou valores menores e estatisticamente significativos de CBM em relação ao óleo da região Sudeste do Brasil para as bactérias *S. aureus*, *B. cereus*, *S. mutans*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*.

Tabela 4. Concentrações Inibitórias Mínimas (MIC) e Concentrações Bactericidas Mínimas (MBC) dos óleos essenciais de *B. dracunculifolia*.

Cepas	Óleos essenciais de <i>B. dracunculifolia</i>					
	Região Centro-Oeste (mg/mL)		Região Sudeste (mg/mL)		Região Sul (mg/mL)	
	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0,10 ^a	0,05 ^b	0,20 ^c	0,10 ^a	0,30 ^d	0,10 ^a
<i>B. cereus</i> ATCC 14579	0,05 ^a	0,03 ^a	0,15 ^b	0,10 ^c	0,08 ^c	0,05 ^a
<i>S. mutans</i> ATCC 25175	0,10 ^a	0,05 ^b	0,20 ^c	0,10 ^a	0,15 ^d	0,10 ^a
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	0,10 ^a	0,05 ^b	0,20 ^c	0,15 ^d	0,20 ^c	0,10 ^a
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0,08 ^a	0,05 ^b	0,20 ^c	0,10 ^a	0,15 ^d	0,10 ^a
<i>K. pneumoniae</i> ATCC BAA-1706	0,08 ^a	0,05 ^b	0,20 ^c	0,05 ^b	0,15 ^d	0,10 ^a
<i>S. enterica</i> ATCC 14028	0,08 ^a	0,05 ^b	0,15 ^c	0,10 ^a	0,15 ^c	0,10 ^a
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,10 ^a	0,08 ^a	0,15 ^b	0,10 ^a	0,15 ^b	0,10 ^a

Letras diferentes dentro da mesma linha significam diferenças significativas em $p < 0,05$ de acordo com o teste de Tukey no nível de confiança de 95%

Os resultados da CIM do presente estudo para a bactéria *S. aureus* (0,05-0,10 mg/mL) foram semelhantes aos relatados por SALAZAR et al. (2018) que encontraram CIM de 0,10 mg/mL para *S. aureus* utilizando óleo essencial de *B. dracunculifolia* proveniente de uma reserva da Mata Atlântica no estado do Paraná, região Sul do Brasil. Os resultados de CBM deste estudo para bactérias *S. aureus* variaram de 0,10 a 0,30 mg/mL. VEIGA et al. (2017) relataram valores de CBM de 0,30 mg/mL para *S. aureus* utilizando um extrato etanólico de *B. dracunculifolia*, mostrando que o extrato obtido das folhas da planta também apresenta atividade antimicrobiana. BARBOSA et al. (2015) relataram que o óleo essencial de *B. dracunculifolia* da cidade de Botucatu, São Paulo (região Sudeste do Brasil) apresentou atividade contra cepas de *S. aureus* MRSA (cepas resistentes a antimicrobianos beta-lactâmicos), com valores de CIM de 6,7-8,4 mg/mL.

No presente estudo, os valores de CBM de 0,05-0,30 mg/mL para *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* foram inferiores aos relatados por CAZELLA et al. (2019), que observaram os seguintes valores de CBM: 2,10 mg/mL para *S. aureus*, 1,50 mg/mL para *B. cereus*, 8,43 mg/mL para *E. coli* e 2,10 mg/mL para *P. aeruginosa*, usando óleo essencial de *B. dracunculifolia* proveniente da cidade de Cascavel, estado do Paraná, região Sul do Brasil.

Os três óleos essenciais de *B. dracunculifolia* no presente estudo apresentaram valores de CIM (0,03-0,15 mg / mL) e CBM (0,05-0,30 mg / mL) comparáveis a outros óleos essenciais que foram estudados por sua reconhecida atividade antimicrobiana, como: óleo essencial de canela (*Cinnamomun zeylanicum*) (valores de CBM de 0,25 mg/mL para *S. aureus*, *S. enterica* e *E. coli* e 0,80 mg/mL para *P. aeruginosa*) (BARBOSA et al., 2015); óleo essencial de cravo (*Syzygium aromaticum*) (valores CIM de 0,02 mg/mL para *S. aureus*, *S. enterica* e *E. coli*; valores de CBM de 0,35 mg/mL para *S. enterica* e *E. coli* e de 0,40 mg/mL para *S. aureus*) (FARIAS et al., 2019); óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) (valores CIM de 0,15 mg/mL para *Acinetobacter baumannii* e de 0,59 mg/mL para *K. pneumoniae* e *Serratia marcescens*) (VASCONCELOS et al., 2019) e óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) (valores de CIM de 0,81 mg/mL para *K. pneumoniae* e de 0,95 mg/mL para *E. coli*) (FOURNOMITI et al., 2015).

Não há consenso na literatura sobre os valores de CIM em relação à potência de sua atividade antimicrobiana. SILVA et al. (2013) adotaram a seguinte escala para classificar o efeito antibacteriano: valores de CIM variando de 0,1 a 0,5 mg/mL foram classificados como ativos; valores de CIM variando entre 0,5 e 1 mg/mL foram considerados moderadamente ativos e valores de CIM acima de 2 mg/mL foram classificados como inativos. AIRES et al. (2016) apresentaram a seguinte classificação: valores de CIM $\leq 0,1$ mg/mL foram classificados como de forte atividade antibacteriana; valores de CIM entre 0,6 e 1,5 mg/mL foram classificados como atividade antibacteriana moderada e valores de CIM $> 1,0$ mg/mL foram classificados como nulos (sem atividade antibacteriana). Os resultados do presente estudo mostraram valores de CIM entre 0,03 e 0,15 mg/mL e, portanto, os óleos essenciais de *B. dracunculifolia* foram classificados como tendo atividade antibacteriana ativa ou moderada para todas as cepas bacterianas testadas.

4.2. Propriedades químicas dos óleos essenciais de *B. dracunculifolia*

A Tabela 5 apresenta os resultados da atividade antioxidante determinada pelos métodos DPPH e ABTS e do teor de compostos fenólicos para os três óleos essenciais de *B. dracunculifolia*. O óleo essencial da região Centro-Oeste do Brasil apresentou valores de atividade antioxidante mais elevados e estatisticamente significativos em relação aos óleos das regiões Sudeste e Sul do Brasil. E os óleos essenciais das regiões Centro-Oeste e Sul do Brasil apresentaram valores mais elevados e estatisticamente significativos de teor de compostos fenólicos em relação ao óleo da região Sudeste do Brasil. Os compostos fenólicos são uma das

classes mais importantes de antioxidantes naturais e estão intimamente relacionados com a atividade antioxidante das plantas (CHRYSARGYRIS et al., 2020).

Poucos estudos relatam a atividade antioxidante do óleo essencial de *B. dracunculifolia*. LUCHESI et al. (2020) encontraram um valor de atividade antioxidante muito baixo de 0,012 mM TE/mL medido pelo método DPPH de um óleo essencial de *B. dracunculifolia* do estado do Paraná, na região Sul do Brasil. PAROUL et al. (2016) analisaram a atividade antioxidante pelo método DPPH dos óleos essenciais de *B. dracunculifolia* e *B. trimera* da cidade de Erechim, no estado do Rio Grande do Sul, região Sul do Brasil e relataram resultados semelhantes aos resultados do presente estudo com 53,78% de inibição do radical DPPH pelo óleo essencial de *B. dracunculifolia* e 43,51% da inibição do radical DPPH pelo óleo essencial de *B. trimera*.

Tabela 5. Atividade antioxidante e conteúdo de compostos fenólicos dos óleos essenciais de *B. dracunculifolia*.

Óleos essenciais	DPPH (mM TE/mL)	DPPH % Inibição	ABTS (mM TE/mL)	Compostos Fenólicos (mg GAE/mL)
Centro-oeste	5,77±0,18 ^a	50,82±1,59 ^a	113,63±2,66 ^a	2,83±0,01 ^a
Sudeste	0,64±0,05 ^b	40,56±3,69 ^b	98,91±0,16 ^b	1,24±0,05 ^b
Sul	2,15±0,02 ^c	49,40±0,47 ^c	102,62±2,73 ^b	3,06±0,01 ^a

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão de três repetições. Letras diferentes na mesma coluna significam diferenças significativas em $p < 0,05$ de acordo com o teste de Tukey no nível de confiança de 95%.

As três amostras de óleos essenciais apresentaram capacidade antioxidante semelhante ou superior a outros óleos essenciais relatados na literatura. MARIN et al. (2016) analisaram a atividade antioxidante usando o método DPPH dos óleos essenciais de erva-doce (*Foeniculum vulgare*), salsa (*Petroselinum crispum*) e lavanda (*Lavandula officinalis*) provenientes da Espanha e os resultados mostraram que o óleo essencial de salsa apresentou a maior atividade antioxidante, com 64,28% de inibição do radical DPPH, seguido pelo óleo essencial de lavanda (33,54%) e óleo essencial de erva-doce (21,17%). SEMENIUC et al. (2018) determinaram a capacidade antioxidante dos óleos essenciais de salsa, manjeriço e tomilho usando o radical

ABTS e a maior capacidade antioxidante foi observada no óleo essencial de tomilho (197,0 $\mu\text{M TE/mL}$), seguido de manjeriço (105,0 $\mu\text{M TE/mL}$) e salsa (39,4 $\mu\text{M TE/mL}$).

VEIGA et al. (2017) relataram valores semelhantes de compostos fenólicos totais (aproximadamente 2,00 mg/mL) no extrato alcoólico de *B. dracunculifolia* da cidade de Bambuí, no estado de Minas Gerais, região Sudeste do Brasil, em comparação com os valores encontrados para os óleos essenciais neste estudo (1,24-3,06 mg/mL). De acordo com CAMPOS et al. (2016), *B. dracunculifolia* apresenta alta proporção de ácidos fenólicos como ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido p-cumárico, artemillin C, drupanina e ácido 2,3-dihidrocinnâmico. MARIN et al. (2016) relataram resultados semelhantes para o conteúdo fenólico total dos óleos essenciais de salsa (3,88 mg GAE/mL), erva-doce (2,63 mg GAE/mL) e lavanda (1,38 mg GAE/mL).

No presente estudo, o óleo essencial de *B. dracunculifolia* da região Centro-Oeste do Brasil apresentou melhor atividade antibacteriana e capacidade antioxidante do que os óleos essenciais de *B. dracunculifolia* das regiões Sudeste e Sul do Brasil. Devido às características climáticas da região do Cerrado brasileiro, marcada por inverno seco e verão chuvoso (FERREIRA et al., 2003), associadas aos resultados obtidos, é possível que a coleta de folhas no inverno tenha levado a um aumento na eficiência da óleo essencial. De acordo com CHRYSARGYRIS et al. (2020), diferentes condições ambientais resultaram em diferenças significativas na composição química e atividade antioxidante para a maioria dos óleos essenciais das plantas estudadas. Essas descobertas podem ser usadas para introduzir o cultivo dessas plantas em ecossistemas específicos para produzir produtos de alto valor agregado (CHRYSARGYRIS et al., 2020).

A Figura 11 mostra os espectros de FTIR de óleos essenciais de *B. dracunculifolia*. Os compostos dos óleos essenciais apresentam muita complexidade e diversidade, porém, os espectros para todas as amostras na faixa de 4000-600 cm^{-1} são bastante semelhantes. O espectro de FTIR dos óleos essenciais de *B. dracunculifolia* indica picos posicionados em $\sim 2900 \text{ cm}^{-1}$, $\sim 1466 \text{ cm}^{-1}$, $\sim 1380 \text{ cm}^{-1}$ e 900 cm^{-1} . Outros sinais IR aparecem na região ~ 1600 - 600 cm^{-1} junto com o pico menor evidente em $\sim 1600 \text{ cm}^{-1}$.

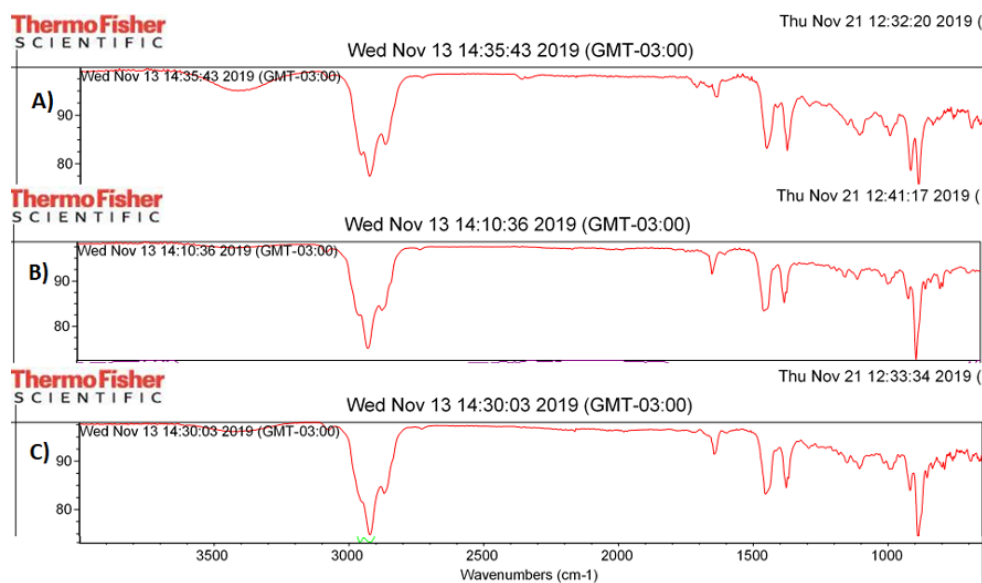


Figura 11. Espectros de FTIR de: A) óleo essencial de *B. dracunculifolia* da região Centro-Oeste do Brasil; B) óleo essencial de *B. dracunculifolia* da região Sudeste do Brasil; C) óleo essencial de *B. dracunculifolia* da região Sul do Brasil.

As bandas posicionadas em $\sim 2900 \text{ cm}^{-1}$ correspondem aos trechos C – H assimétricos e simétricos (CH₃ e CH₂) dos hidrocarbonetos ligados ao oxigênio (TARAJ et al., 2017) e podem ser atribuídas à presença de nerolidol (MADHUSUDHANAMURTHY et al., 2013) e espatulenol (ORDOUDI et al., 2020), os principais compostos sesquiterpenos do óleo essencial de *B. dracunculifolia* (BARBOSA et al., 2015; CAZELLA et al., 2019).

Os trechos C=C aparecem em $\sim 1660\text{-}1630 \text{ cm}^{-1}$, portanto, o IR em $\sim 1600 \text{ cm}^{-1}$ pode pertencer ao pineno (CIKO et al., 2016) e/ou limoneno (AUTA et al., 2018). É conhecido que os grupos isopropil e gem-dimetil dão origem a um modo guarda-chuva dividido com dois picos no espectro de IV posicionados em $\sim 1385 \text{ a } 1365 \text{ cm}^{-1}$. A divisão é causada pela interação vibracional entre os modos guarda-chuva dos dois grupos metil. Além disso, a banda em $\sim 1466 \text{ cm}^{-1}$ indica a presença de um CH₃, um CH₂ ou ambos os grupos. As estruturas químicas de cariofileno e germacreno consistem em grupos isopropil ou isobutil, portanto, os picos em $\sim 1466 \text{ cm}^{-1}$ e em $\sim 1380 \text{ cm}^{-1}$ podem pertencer a cariofileno e germacreno (TARAJ et al., 2019). CAZELLA et al. (2019) relataram que os principais compostos do óleo essencial de *B. dracunculifolia* da cidade de Guaraniaçu, no estado do Paraná, região Sul do Brasil foram: espatulenol (27,4%), nerolidol (23,1%), pineno (5,6%), cariofileno (4,6%) e germacreno (4,5%). E ALVES et al. (2018) mostraram que a composição química do óleo essencial de *B. dracunculifolia* da cidade de Pitangui, no estado de Minas Gerais, região sudeste do Brasil, era

composta por: nerolidol (30,6%), germacreno (9,4%), espatulenol (6,8 %), cariofileno (5,8%) e limoneno (4,5%).

A presença de terpenos nos óleos essenciais de *B. dracunculifolia* tem sido comumente associada à sua ação antimicrobiana, uma vez que os terpenos têm efeito tóxico na estrutura e função das membranas celulares, resultando em aumento da fluidez e permeabilidade e alteração do processo de transporte iônico, levando à morte celular (WIŃSKA et al., 2019; VEIGA et al., 2017).

4.3. Caracterização das nanoemulsões contendo óleo essencial de *B. dracunculifolia*

As seis diferentes formulações de nanoemulsões contendo óleo essencial de *B. dracunculifolia* apresentaram diâmetro com médias entre 13,14 e 56,84 nm, valores apresentados na Tabela 6. De acordo com JAFARI e MCCLEMENTS (2018), para serem consideradas nanoemulsões, o tamanho das gotículas deve estar abaixo de 200 nm. E segundo SHETH et al. (2020), as nanoemulsões devem apresentar gotículas com diâmetro de 100 nm ou menores. Desta forma, todas as seis formulações apresentaram gotículas com tamanhos adequados para serem consideradas nanoemulsões.

Tabela 6. Caracterização das nanoemulsões contendo óleo essencial de *B. dracunculifolia*.

Formulações	Tamanho (nm)	SOR	PDI	Potencial Zeta (-mV)	Condutividade (μ S/cm)	pH
1	56,84 \pm 0,80	0,50	0,29 \pm 0,02	4,14 \pm 0,91	105,70	7,55
2	42,89 \pm 0,43	0,57	0,35 \pm 0,07	12,77 \pm 2,10	110,80	7,01
3	20,45 \pm 0,27	0,67	0,18 \pm 0,01	9,82 \pm 0,99	116,00	6,95
4	16,62 \pm 0,15	0,73	0,20 \pm 0,01	23,03 \pm 2,15	119,60	6,92
5	22,46 \pm 3,88	0,80	0,42 \pm 0,11	22,67 \pm 1,67	120,80	6,84
6	13,14 \pm 2,65	0,89	0,12 \pm 0,03	19,87 \pm 4,90	120,50	6,73

SOR: Razão óleo-surfactante. PDI: Índice de Polidispersão.

No estudo de SEUGLING et al. (2019), as nanoemulsões contendo óleo essencial de *B. dracunculifolia* apresentaram gotículas maiores, variando de 168,20 a 181,70 nm. Isso também foi reportado no estudo de MOGHIMI et al. (2015), onde foram obtidas nanoemulsões de óleo essencial de tomilho (*Thymus daenensis*) com gotículas de 143 nm.

Já no estudo de PERIASAMY, ATHINARAYANAN e ALSHATWI (2016), as formulações contendo óleo essencial de cominho (*Nigella sativa* L.) apresentaram gotículas com tamanhos menores, similares aos resultados do presente estudo, variando entre 20 e 50 nm de diâmetro. De acordo com NIRMALA et al. (2020) um tamanho menor ajuda a suprimir a coalescência e a precipitação das gotículas, minimizando, assim, a quebra da nanoemulsão.

No estudo de NIRMALA et al. (2020), foi verificada a influência da concentração do surfactante e do tempo de sonicação no tamanho das gotículas das nanoemulsões contendo óleo essencial de salsa (*Apium graveolens*). Observou-se que o aumento da concentração do surfactante resultou em gotículas menores (no período de sonicação de 20 min. foram observados diâmetros de gotícula de 54,5, 27,4 e 23,4 nm para as relações de óleo: surfactante de 1:1, 1:2 e 1:3, respectivamente). E um tamanho de gotícula reduzido também foi notado com o aumento no tempo de sonicação (para a formulação onde a razão óleo: surfactante foi de 1:3, diâmetros de 29,2, 26,3 e 23,4 nm foram observados nos tempos de sonicação de 10, 15 e 20 min, respectivamente). No presente estudo, a concentração de surfactante e o tempo de sonicação foram fixados e, portanto, não foram variáveis que interferiram no tamanho das gotículas das nanoemulsões.

No trabalho de ANWER et al. (2014), as nanoemulsões contendo óleo essencial de cravo-da-índia, apresentaram bastante variação de tamanho das gotículas (29,1-136,9 nm) entre as diferentes formulações testadas e observou-se que as formulações contendo maiores concentrações de fase oleosa apresentaram gotículas com tamanhos maiores. No nosso estudo observou-se que as nanoemulsões formuladas com as maiores concentrações de óleo essencial de *B. dracunculifolia* apresentaram tamanhos de gotículas maiores que as formulações que utilizaram menores concentrações de óleo essencial.

Essas variações no tamanho das gotículas nas diferentes formulações das nanoemulsões podem ocorrer devido à diferença entre os procedimentos utilizados para a formulação das nanoemulsões, onde o tamanho das gotículas tende a diminuir com o aumento do tempo de sonicação ou pela pressão utilizada na homogeneização, pela qualidade e composição de cada óleo essencial, uma vez que cada óleo apresenta características físico-químicas distintas, incluindo solubilidade, densidade, gravidade específica e índice de refração variados, bem como, pela concentração de surfactante utilizada, uma vez que uma maior concentração de surfactantes nas nanoemulsões pode diminuir o diâmetro das gotículas (ARTIGAS-ARTIGAS et al., 2019; NIRMALA et al., 2020).

A proporção de surfactante na nanoemulsão pode ser verificada pelo valor da razão óleo-surfactante (SOR) (Figura 2), valor este que se encontra abaixo de 1 em nanoemulsões (JAFAR e MCCLEMENTS, 2018; PAVONI et al., 2020).

$$\frac{\% \text{ Tensioativo}}{(\% \text{ Tensioativo} + \% \text{ óleo essencial})}$$

Figura 12. Cálculo da razão óleo-surfactante (SOR).

No presente trabalho, os valores de SOR variaram entre 0,50 e 0,89, desta forma os valores estão adequados para nanoemulsões. Percebe-se ainda que em cinco das seis formulações, quanto maior o valor de SOR, menor o tamanho das gotículas, como apresentado na Tabela 2. Este fato ocorre visto que um aumento na proporção de surfactante pode levar à uma adsorção na interface das gotículas, formando uma camada protetora, evitando assim o processo de coalescência, ou seja, processo pelo qual duas ou mais gotículas se fundem para formar uma gotícula maior (JAFARI et al., 2018). Em relação à formulação 5, um aumento no valor de SOR não correspondeu a gotículas de menor tamanho como esperado. Esta variação pode ter ocorrido por erros durante a leitura ou no preparo da nanoemulsão.

No estudo de DUARTE et al. (2015), a nanoemulsão feita com 5% de óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e 5% de Tween 20 apresentou SOR de 0,50, valor igual ao valor na formulação 1 do presente trabalho preparada com 20% de óleo essencial de *B. dracunculifolia* e 20% de Tween 80. No estudo de Moghimi et al. (2016), também foi obtido um valor de SOR de 0,50, com uso de 2% de óleo essencial de tomilho (*Thymus daenensis*) e 2% de Tween 80. As diferenças nos valores de SOR estão relacionadas às diferentes proporções de óleo/surfactante utilizadas para cada formulação, conferindo características distintas para cada nanoemulsão, como variações no tamanho médio e na morfologia das gotículas (GUPTA et al., 2016; KIRUTHIGA, KRISHNAKUMAR e KANNAN, 2019).

No que diz respeito ao índice de polidispersão (PDI), este fornece informações sobre a homogeneidade da distribuição dos tamanhos das gotículas nas nanoemulsões (NIRMALA et al., 2020). O valor numérico de PDI varia de 0,0 (para uma amostra perfeitamente uniforme em relação ao tamanho das gotículas) a 1,0 (para uma amostra altamente polidispersa com populações de diferentes tamanhos de gotículas) (DANAEI et al., 2018; GURPREET e SINGH, 2018).

Segundo DANAEI et al. (2018), valores de PDI menores que 0,05 podem ser vistos principalmente em amostras altamente monodispersas (uma distribuição totalmente

monodispersa significa que todas as gotículas apresentam o mesmo tamanho) e valores de PDI maiores que 0,7 indicam que a amostra tem uma distribuição altamente polidispersa, ou seja, com populações de diferentes tamanhos de gotículas. No presente trabalho, os valores de PDI variaram de 0,12 a 0,42 e desta forma, as nanoemulsões estão com valores de PDI aceitáveis.

Resultados similares ao do presente trabalho podem ser encontrados na literatura. No estudo de SEUGLING et al. (2019), a nanoemulsão produzida com de óleo essencial de *B. dracunculifolia* apresentou PDI de 0,23. No estudo de YAZGAN (2020), a nanoemulsão contendo óleo essencial de sálvia (*Salvia officinalis*) apresentou PDI de 0,12, valor idêntico ao valor da nanoemulsão 6. E no estudo de OZOGUL et al. (2020), a nanoemulsão contendo óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) apresentou PDI de 0,16.

No que se refere ao potencial Zeta, este é utilizado para medir a carga superficial de nanogotícula quando colocadas em um líquido (GURPREET e SINGH, 2018). A superfície de uma gotícula carregada atrai uma fina camada de carga oposta e se liga firmemente a ela, formando uma fina camada líquida; quando a gotícula se difunde em solução, ela será envolvida por uma camada difusa externa que consiste em íons fracamente associados e como resultado final é criada uma dupla camada elétrica. O potencial Zeta é o potencial elétrico dessa camada dupla e é determinado através da medição da velocidade das partículas carregadas que se movem em direção ao eletrodo através da solução de amostra na presença de um campo elétrico externo. O potencial Zeta das nanogotículas pode variar de + 100 a -100 mV e a sua medida é utilizada para prever a estabilidade da dispersão e seu valor depende das propriedades físico-químicas do composto, presença de eletrólitos e sua adsorção (SHNOUDEH et al., 2019).

Nanogotículas com valores de potencial Zeta $> +25$ mV ou < -25 mV geralmente têm alto grau de estabilidade da dispersão (SHNOUDEH et al., 2019). A magnitude do potencial zeta permite a avaliação da estabilidade das gotículas em suspensão, pois se todas as gotículas exibirem um alto valor negativo ou positivo desse potencial, eles repelirão e impedirão a agregação. Quando o potencial zeta tem um valor próximo a zero, esta ausência de carga superficial pode facilitar as interações entre gotículas, e promove processos de floculação ou agregação, em alguns casos (SEIBERT et al., 2018).

No presente trabalho, para todas as formulações de nanoemulsões, foram observadas cargas superficiais negativas (-4,14 a -23,03 mV), entretanto nenhuma delas foi menor que -25 mV, indicando uma possível baixa estabilidade das nanoemulsões. Entretanto, de acordo com Kumar e Dixit (2017), gotículas de tamanho muito pequeno, como as gotículas do presente trabalho, têm alta mobilidade e baixa propriedade de dispersão de luz, o que pode levar a uma interferência na leitura do potencial Zeta.

No estudo de SEUGLING et al. (2019), o potencial Zeta da nanoemulsão contendo óleo essencial de *B. dracunculifolia* foi $< -35,4$ mV. No trabalho de ANWER et al. (2014), foram observados valores de potencial Zeta na faixa de $-48,6$ a $-31,4$ mV para as nanoemulsões contendo óleo essencial de cravo-da-índia. No trabalho de SEIBERT et al. (2018), a nanoemulsão formulada com óleo essencial de capim-santo (*Cymbopogon densiflorus*) apresentou um valor de $-8,98$ mV para o potencial Zeta, e apesar de não ser um valor ideal, a nanoemulsão se manteve estável no estudo de estabilidade acelerada.

No que diz respeito à condutividade, este parâmetro é utilizado para a medida da passagem da corrente elétrica (MORADI, BARATI, 2019). O valor de condutividade determina o número de íons livres no sistema indicando, portanto, a capacidade da nanoemulsão para conduzir eletricidade. Estudos relatam que sistemas óleo/água (O/A) possuem medições de condutividade mais altas do que sistemas água/óleo (A/O), porque a fase externa é a água (AZHAR, ASHARI, SALIM, 2018).

Não há valores estabelecidos na literatura para a condutividade de nanoemulsões, entretanto um valor mais alto de condutividade da nanoemulsão demonstra mais conteúdo de água, que fornece mais espaços para os movimentos dos íons (MORADI, BARATI, 2019). Os valores de condutividade apresentados no presente trabalho variaram entre $105,70$ a $120,80$ $\mu\text{S}/\text{cm}$ e desta forma as nanoemulsões podem ser classificadas como O/A.

No trabalho de SEIBERT et al. (2018), a nanoemulsão formulada com óleo essencial de capim-santo (*Cymbopogon densiflorus*) apresentou condutividade de $159,86$ $\mu\text{S}/\text{cm}$, indicando ser uma nanoemulsão do tipo O/A. No estudo de MORADI e BARATI (2019), a condutividade das nanoemulsões variaram de 140 a 777 $\mu\text{S}/\text{cm}$, indicando que a água era a fase contínua das nanoemulsões preparadas com óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.), *Zataria multiflora* e alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.). No estudo de EL-EKIABY (2019), a nanoemulsão de óleo essencial de manjeriço foi classificada como óleo em água, apresentando condutividade de $203,5$ $\mu\text{S}/\text{m}$.

Em relação ao pH, este é um importante parâmetro para determinar a estabilidade da formulação, uma vez que a flutuação do pH pode indicar a ocorrência de reações químicas que podem afetar a qualidade do produto (MORADI, BARATI, 2019). No presente trabalho, as nanoemulsões apresentaram valores de pH entre $6,73$ e $7,55$. Valores similares podem ser observados no trabalho de MORADI e BARATI (2019), onde o pH das nanoemulsões com óleos essenciais de tomilho (*Thymus vulgaris* L.), *Zataria multiflora* e alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) apresentaram pH nos valores de $6,75$ a $7,93$ sem grandes variações em dois meses, indicando formulações estáveis. No estudo de NARAWI et al. (2020), as nanoemulsões

com óleo essencial de noz-moscada apresentaram pH de 5,6 e 5,3, indicando valores adequados para administração tópica na pele, uma vez que o pH da pele é levemente ácido, na faixa de 6,0.

4.4. Atividade antibacteriana das nanoemulsões contendo óleo essencial de *B. dracunculifolia*

Os valores de CIM e CBM para as nanoemulsões contendo óleo essencial de *B. dracunculifolia* estão apresentados na Tabela 7. Foram obtidos valores de CIM de <0,03 a 0,08 mg/mL para bactérias Gram-positivas e de <0,03 a 0,15 mg/mL para bactérias Gram-negativas. Resultados comparáveis de CIM foram observados no estudo de SUNDARARAJAN et al. (2018), onde a nanoemulsão de manjeriço (*Ocimum basilicum*) apresentou valores de CIM de 0,02 mg/mL para *Enterococcus faecalis* e 0,01 mg/mL para *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* Paratyphi.

Tabela 7. CIM e CBM das nanoemulsões formuladas com óleo essencial de *B. dracunculifolia*.

Cepas	Nanoemulsões (mg/mL)	
	CIM	CBM
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0,08	0,20
<i>B. cereus</i> ATCC 14579	<0,03	0,20
<i>S. mutans</i> ATCC 25175	<0,03	0,10
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	0,08	0,20
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0,05	>0,20
<i>K. pneumoniae</i> ATCC BAA-1706	0,15	>0,20
<i>S. enterica</i> ATCC 14028	<0,03	>0,20
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,05	>0,20

Os valores de CIM das nanoemulsões do presente estudo demonstram atividade antibacteriana superior quando comparados a outros trabalhos. No estudo de YAZGAN, OZOGUL e KULEY (2019), as nanoemulsões contendo óleo essencial de limão (*Citrus limonum*), apresentaram valores de 3,12 mg/mL para *S. aureus* e 6,25 mg/mL para *Klebsiella pneumoniae*. No estudo de GHADERI et al. (2017), a nanoemulsão formulada com óleo essencial de tomilho (*Thymus daenensis*), apresentou CIM de 2 mg/mL para *Pseudomonas aeruginosa*. Nas análises de HASSANSHAHIAN, SAADATFAR e MASOUMIPOUR (2020), a nanoemulsão contendo óleo essencial de *Alhagi maurorum* apresentou CIM de 1,75 mg/mL

para *B. cereus*, 3,25 mg/mL para *P. aeruginosa*, 1,75 mg/mL para *E. coli*, 6,25 mg/mL para *K. pneumoniae* e 6,25 mg/mL para *S. aureus*. E no estudo de PRAKASH et al. (2019), a atividade antibacteriana de nanoemulsões de diferentes óleos essenciais foi testada frente a *Salmonella enterica*, sendo que a nanoemulsão de capim-limão apresentou valor de CIM de 1 mg/mL e a nanoemulsão de óleo essencial de coentro apresentou valor de CIM de 2 mg/mL.

Em relação à CBM, os valores variaram entre 0,10 e 0,20 mg/mL para Gram-positivas e todos os valores foram >0,20 mg/mL para Gram-negativas. No estudo de HASSANSHAHIAN, SAADATFAR e MASOUMIPOUR (2020), a nanoemulsão contendo óleo essencial de *Alhagi maurorum* apresentou CBM de 6,25 mg/mL para *B. cereus* e 3,25 mg/mL para *E. coli*. Os valores de CBM do presente trabalho mostraram atividade bactericida superior para bactérias Gram-positivas em relação as Gram-negativas.

No estudo de YAZGAN, OZOGUL e KULEY (2019), as nanoemulsões contendo óleo essencial de limão (*Citrus limonum*), apresentaram valores de CBM >25 mg/mL para *S. aureus*, *E. faecalis* e *K. pneumoniae*, indicando a necessidade de testes com maiores concentrações de óleo essencial nas nanoemulsões para atingir os valores de CBM. Nas análises de GHADERI et al. (2017), a nanoemulsão formulada com óleo essencial de tomilho (*Thymus daenensis*), apresentou valor de CBM >8 mg/mL para *Pseudomonas aeruginosa*, indicando também a necessidade de testes com maiores concentrações de óleo essencial nas nanoemulsões para atingir os valores de CBM.

As variações dos valores de CIM e CBM entre as nanoemulsões estão relacionadas a diversos fatores, inicialmente, às próprias características de cada óleo essencial utilizado na formulação. Os óleos essenciais podem ser extraídos de uma grande variedade de plantas, apresentando-se como uma complexa combinação de metabólitos secundários voláteis, sendo que a sua composição varia junto com fatores abióticos locais (topografia, umidade, temperatura e fatores edáficos), fatores seletivos bióticos (fauna e flora associadas), tratamento pós-colheita, métodos de extração e condições de conservação, levando a uma variedade de propriedades biológicas (FOKOU, DONGMO e BOYOM, 2019).

O outro ponto de interesse é a formulação da nanoemulsão. A depender das concentrações de óleo/água/surfactante e da eficiência do equipamento de emulsificação usado para obter um tamanho de gota reduzido, a emulsão final pode ter características diferentes e propriedades diferentes, uma vez que óleos essenciais dispersos em diferentes nanoformulações podem atuar por meio de diversos mecanismos de ação (ECHEVERRÍA, ALBUQUERQUE, 2019). As gotículas de tamanho reduzido da nanoemulsão apresentam maior área de superfície, proporcionando maior absorção, fato este que é observado nas formulações do presente

trabalho. É sabido também que o surfactante utilizado também pode alterar o efeito antimicrobiano de nanoemulsões, posto que a permeabilidade da membrana e absorção celular é “surfactante dependente” já que a carga de gotículas é conhecida por influenciar a eficácia de antimicrobianos nanoemulsionados (LYRA, 2019).

A vantagem de se usar a nanoemulsão em relação aos óleos essenciais in natura, pode ocorrer pelo fato que produtos naturais hidrofóbicos podem precipitar após diluição com água, e a solubilidade deles pode ser melhorada com o uso de veículos, como as emulsões. Isso envolve o uso de um surfactante ou emulsificante, que auxilia a dispersar o produto natural por todo o meio de ensaio, promovendo o contato com as células bacterianas e reduzindo o risco de resultados falso-negativos (CUSHINIE et al., 2020).

A Tabela 8 traz a comparação entre os resultados de disco-difusão encontrados para a nanoemulsão e para os óleos in natura. Percebe-se que a nanoemulsão apresentou halos de inibição somente para três cepas (*S. aureus*, *B. cereus* e *S. mutans*), enquanto os óleos essenciais in natura apresentaram resultados para quatro das oito cepas testadas (*S. aureus*, *B. cereus*, *S. mutans* e *E. faecalis*), sendo estas Gram-positivas.

Tabela 8. Comparação entre os resultados de disco-difusão encontrados para a nanoemulsão e para os óleos in natura.

Microrganismos Testados	Diâmetro dos halos em milímetros			
	Nanoemulsão	Óleo do Centro Oeste	Óleo do Sudeste	Óleo do Sul
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	18,5 ± 0,21 ^a	24,0 ± 0,20 ^b	19,4 ± 0,57 ^a	25,0 ± 0,01 ^b
<i>B. cereus</i> ATCC 14579	19,5 ± 0,21 ^a	32,0 ± 0,15 ^b	21,0 ± 0,11 ^a	33,0 ± 2,64 ^b
<i>S. mutans</i> ATCC 25175	20,0 ± 0,14 ^a	21,7 ± 0,43 ^{a, b}	23,0 ± 0,10 ^b	26,7 ± 0,88 ^c
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	NI	22,3 ± 0,60 ^a	20,7 ± 0,57 ^a	23,0 ± 0,64 ^a
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	NI	NI	NI	NI
<i>K. pneumoniae</i> ATCC BAA-1706	NI	NI	NI	NI
<i>S. enteritidis</i> ATCC 14028	NI	NI	NI	NI
<i>E. coli</i> ATCC 25922	NI	NI	NI	NI

NI: Não houve inibição. Letras diferentes dentro da mesma linha significam diferenças significativas em $p < 0,05$ de acordo com o teste de Tukey no nível de confiança de 95%.

Resultados similares podem ser vistos no estudo de LEE et al. (2019), onde foi obtido uma zona de inibição de 19 mm para *S. aureus* com a nanoemulsão de óleo essencial de orégano.

No trabalho de HASSSANZADEH, ALIZADEH e BARI (2018), as nanoemulsões de óleo essencial de alho apresentaram zonas de inibição para *S. aureus* variando entre 17,6 e 22,5 mm. Já no estudo de YAZGAN (2020), a nanoemulsão com óleo essencial de sálvia, conseguiu apresentar zona de inibição para *E. faecalis*, com o valor de 11,6 mm. No estudo de LU et al. (2018), a nanoemulsão de óleo essencial de citral apresentou zona de inibição de 19,2 mm para *S. aureus* e 10,2 mm para *E. faecalis*.

A Tabela 9 traz a comparação entre os resultados de CIM encontrados para a nanoemulsão e os valores de CIM encontrados com os óleos in natura.

Tabela 9. Comparação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) da nanoemulsão e dos óleos in natura.

Cepas	Nanoemulsão	Centro-oeste	Sudeste	Sul
	CIM	CIM	CIM	CIM
(mg/mL)				
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0,08 ^a	0,05 ^b	0,10 ^a	0,10 ^a
<i>B. cereus</i> ATCC 14579	<0,03	0,03 ^a	0,10 ^b	0,05 ^a
<i>S. mutans</i> ATCC 25175	<0,03	0,05 ^a	0,10 ^b	0,10 ^b
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	0,08 ^a	0,05 ^b	0,15 ^c	0,10 ^a
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0,05 ^a	0,05 ^a	0,10 ^b	0,10 ^b
<i>K. pneumoniae</i> ATCC BAA-1706	0,15 ^a	0,05 ^b	0,05 ^b	0,10 ^c
<i>S. enterica</i> ATCC 14028	<0,03	0,05 ^a	0,10 ^b	0,10 ^b
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,05 ^a	0,08 ^b	0,10 ^b	0,10 ^b

Letras diferentes dentro da mesma linha significam diferenças significativas em $p < 0,05$ de acordo com o teste de Tukey no nível de confiança de 95%.

Para a cepa de *S. aureus*, o valor de CIM da nanoemulsão não foi estatisticamente relevante quando comparado aos valores dos óleos do Sudeste e do Sul. E houve diferença estatística quando comparado ao óleo do Centro-oeste, entretanto o óleo in natura apresentou melhor ação.

Para as cepas de *B. cereus*, *S. mutans* e *S. enterica* não foi possível calcular a diferença estatística, uma vez que os valores de CIM da nanoemulsão não foram determinados (<0,03), mas percebe-se que estes valores serão menores do que os valores de CIM dos óleos in natura,

demonstrando-se assim a capacidade de potencialização da atividade antibacteriana com a nanoemulsão. Faz-se necessário novos testes com concentrações menores.

Para a cepa de *E. faecalis*, não houve diferença estatística do valor de CIM da nanoemulsão quando comparado ao óleo do Sul. Porém, houve diferença estatística quando comparado ao óleo do Sudeste, demonstrando maior potência, e quando comparado ao óleo do Centro-oeste, a nanoemulsão foi menos potente.

Em relação à cepa de *P. aeruginosa*, o valor de CIM da nanoemulsão foi estatisticamente relevante quando comparado aos óleos do Sul e Sudeste, demonstrando uma maior ação antibacteriana, entretanto não houve diferença estatística quando comparado ao óleo do Centro-oeste. Para a cepa de *K. pneumoniae*, a nanoemulsão demonstrou-se menos potente do que todos os óleos in natura. Para a cepa de *E. coli*, o valor de CIM da nanoemulsão foi estatisticamente relevante quando comparado aos três óleos, demonstrando uma maior ação antibacteriana.

A Tabela 10 traz a comparação entre os resultados de CBM encontrados para a nanoemulsão e valores de CBM encontrados com os óleos in natura.

Tabela 10. Comparação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) da nanoemulsão e dos óleos in natura.

Cepas	Nanoemulsão	Centro-oeste	Sudeste	Sul
	CBM	CBM	CBM	CBM
(mg/mL)				
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0,20 ^a	0,10 ^b	0,20 ^a	0,30 ^c
<i>B. cereus</i> ATCC 14579	0,20 ^a	0,05 ^b	0,15 ^c	0,08 ^d
<i>S. mutans</i> ATCC 25175	0,10 ^a	0,10 ^a	0,20 ^b	0,15 ^c
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	0,20 ^a	0,10 ^b	0,20 ^a	0,20 ^a
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	>0,20	0,08 ^a	0,20 ^b	0,15 ^c
<i>K. pneumoniae</i> ATCC BAA-1706	>0,20	0,08 ^a	0,20 ^b	0,15 ^c
<i>S. enterica</i> ATCC 14028	>0,20	0,08 ^a	0,15 ^b	0,15 ^b
<i>E. coli</i> ATCC 25922	>0,20	0,10 ^a	0,15 ^b	0,15 ^b

Letras diferentes dentro da mesma linha significam diferenças significativas em $p < 0,05$ de acordo com o teste de Tukey no nível de confiança de 95%.

Para a cepa de *S. aureus*, não houve diferença estatística quando comparado os valores da nanoemulsão aos valores do óleo do Sudeste. Houve diferença estatística quando comparada

aos óleos do Centro-oeste e Sul, sendo a nanoemulsão mais potente do que o óleo do Sul e menos potente do que o óleo do Centro-Oeste. Para a cepa de *B. cereus*, a nanoemulsão teve a menor eficácia quando comparada a todos os óleos.

Para a cepa de *S. mutans*, não houve diferença estatística entre a CBM da nanoemulsão e óleo do Centro-oeste, entretanto, o valor de CBM da nanoemulsão foi significativamente relevante quando comparado aos valores do óleo do Sudeste e do Sul, mostrando-se mais potente. Para a cepa de *E. faecalis*, o valor de CBM da nanoemulsão não foi significativamente relevante quando comparado aos valores do Sudeste e do Sul. Houve diferença estatística quando comparado ao óleo do Centro-oeste, entretanto a nanoemulsão foi menos eficaz.

Para as bactérias Gram-negativas, os valores de CBM para nanoemulsões não foram determinados, não sendo possível realizar o cálculo estatístico, entretanto percebe-se que as concentrações necessárias serão maiores que os valores de CBM já encontrados com os óleos essenciais in natura, indicando uma menor potência da nanoemulsão para ação bactericida. Faz-se necessário novos testes com maiores concentrações.

Em relação aos testes de Concentração Inibitória Mínima, percebe-se resultados satisfatórios com as nanoemulsões para seis das oito cepas testadas, onde estas obtiveram resultados com concentrações menores e significativamente relevantes quando comparadas a pelo menos um dos óleos in natura testados, indicando uma potencialização da ação bacteriostática. Entretanto, para os testes de Concentração Bactericida Mínima, as nanoemulsões apresentaram resultados com concentrações menores e significativamente relevantes apenas para *S. aureus* e *S. mutans*, demonstrando que a nanoemulsão não foi capaz de potencializar a ação bactericida para a maioria das cepas testadas quando comparadas aos óleos essenciais in natura.

Resultados similares podem ser vistos no estudo de ÖZOGUL, ÖZOGUL e KULAWIK (2021), onde a incorporação de óleo essencial de toranja no sistema de nanoemulsão resultou em aumento da potência bacteriostática, entretanto, nenhum efeito bactericida foi observado, o que provavelmente foi devido à concentração muito baixa de óleo essencial no sistema de nanoemulsão. No estudo de EL-SAYED e EL-SAYED (2021), é relatado que as nanoemulsões podem apresentar ação bactericida e bacteriostática, a depender das concentrações de óleo essencial utilizadas, sendo que para a ação bactericida, se faz necessário o uso de maiores concentrações. E no estudo de SHAHABI et al. (2021), efeitos bacteriostáticos e bactericidas foram observados, dependendo do tipo de bactéria, da concentração da nanoemulsão e do tempo de exposição.

A diferença entre o efeito bacteriostático e bactericida das nanoemulsões pode estar relacionada a diversos fatores: (1) Estudos de liberação de nanoemulsões *in vitro* mostram um efeito inicial rápido seguido por uma liberação lenta. Assim, foi demonstrado que nanoemulsões podem ser usadas para controlar o comportamento de liberação do óleo essencial. A liberação de doses controladas gera concentrações que ao longo de 24 horas podem levar a um controle do crescimento bacteriano, ocasionando um melhor efeito bacteriostático (PANKEY e SABATH, 2004; GUPTA e VARIYAR, 2016). (2) Compostos considerados bacteriostáticos podem atuar em concentrações mais baixas, enquanto aqueles considerados bactericidas podem necessitar de concentrações mais altas (BAQUERO e LEVIN, 2021). (3) A morte bacteriana é dependente da concentração e tempo: a morte bacteriana dependente da concentração ocorre quando a taxa e extensão da morte aumenta com o as concentrações antibacterianas progressivamente mais altas e a morte bacteriana dependente do tempo ocorre quando o aumento das concentrações antibacterianas maiores que os valores de CIM não resulta em aumentos proporcionais na morte (PANKEY e SABATH, 2004). (4) As distintas propriedades físico-químicas das formulações podem alterar as propriedades antimicrobianas das nanoemulsões (ÖZOGUL, ÖZOGUL e KULAWIK, 2021).

5. CONCLUSÃO

Os três óleos essenciais de *B. dracunculifolia* avaliados no presente estudo apresentaram atividade antibacteriana para as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas testadas. As amostras de óleo essencial de *B. dracunculifolia* apresentaram elevada atividade antioxidante em ambos os ensaios de DPPH e ABTS. O óleo essencial de *B. dracunculifolia* da região Centro-Oeste do Brasil apresentou melhor atividade antibacteriana e capacidade antioxidante do que os óleos essenciais das regiões Sudeste e Sul do Brasil. É possível que o estresse hídrico no inverno do Cerrado brasileiro tenha favorecido o aumento das atividades biológicas para esta espécie.

Em relação as formulações de nanoemulsões contendo óleo essencial de *B. dracunculifolia*, a caracterização apresentou resultados considerados adequados para o tipo de sistema formulado, exceto pelo potencial Zeta que foi acima do esperado, o que pode ser explicado pelo pequeno tamanho das gotículas analisadas. Em relação aos testes de Concentração Inibitória Mínima, percebe-se resultados satisfatórios com as nanoemulsões para seis das oito cepas testadas, onde estas obtiveram resultados com concentrações menores e significativamente relevantes quando comparadas a pelo menos um dos óleos in natura testados, indicando uma potencialização da ação bacteriostática.

Conclui-se que o óleo essencial de *B. dracunculifolia* é um composto natural com atividade antibacteriana promissora e o uso de nanotecnologia pode auxiliar na melhoria das propriedades biológicas apresentadas por ele.

6. REFERÊNCIAS

ABAD, M. J.; BEDOYA, L. M.; BERMEJO, P. Essential oils from the *Asteraceae* family active against multidrug-resistant bacteria. In: Fighting multidrug resistance with herbal extracts, essential oils and their components. Publisher: Academic Press, capítulo 14, p. 205-221, 2013.

ABATCHA, M. G. et al. A trend of *Salmonella* and antibiotic resistance. **Advances in Life Science and Technology**, v. 17, p. 9-21, 2014.

ABDALLAH, I. I.; QUAX, W. J. A Glimpse into the Biosynthesis of Terpenoids. **KnE Life Sciences**, p. 81-98, 2017.

ABREU, A. C.; MCBAIN, A. J.; SIMOES, M. Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents. **Natural Product Reports**, v. 29, n. 9, p. 1007-1021, 2012.

ACHIKA, J. I. et al. A review on the phytoconstituents and related medicinal properties of plants in the *Asteraceae* family. **International Organization of Scientific Research Journal of Applied Chemistry**, v. 7, n. 8, p. 1-8, 2014.

ADIMPONG, D, B. et al. Antimicrobial susceptibility of *Bacillus* strains isolated from primary starters for African traditional bread production and characterization of the bacitracin operon and bacitracin biosynthesis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 22, p. 7903-7914, 2012.

AGOSTINI-COSTA et al. Secondary Metabolites, In: Chromatography and Its Applications, Publisher: IntechOpen, p. 131-164, 2012. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/chromatography-and-its-applications/secondary-metabolites>>

ALI, B. et al. Essential oils used in aromatherapy: A systemic review. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 8, p. 601-611, 2015.

ALMEIDA, N. A. Óleos essenciais e desenvolvimento sustentável na Amazônia: uma aplicação da matriz de importância e desempenho. **Reflexões Econômicas**, n. 2, v. 2., p. 138-158, 2016.

ALVES, K. F. et al. *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) essential oil toxicity to *Culex quinquefasciatus* (Culicidae). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 31, p. 31718-31726, 2018.

ANTUNES, M. et al. Edible coatings enriched with essential oils and their compounds for fresh and fresh-cut fruit. **Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture**, v. 4, n. 2, p. 114-122, 2012.

ANWER, M. K. et al. Enhanced antibacterial effects of clove essential oil by nanoemulsion. **Journal of Oleo Science**, p. ess13213, 2014.

AQUINO, N. C.; ARAÚJO, R. M.; SILVEIRA, E. R. Intraspecific variation of the volatile chemical composition of *Myracrodruon urundeuva* Fr. Allem. (Aroeira-do-Sertão): characterization of six chemotypes. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 5, p. 907-912, 2017.

ARIAS, C. A.; MURRAY, B. E. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 4, p. 266-278, 2012.

ARTIGA-ARTIGAS, M. et al. Nanostructured systems to increase bioavailability of food ingredients. In: **Nanomaterials for Food Applications**. Elsevier, 2019. p. 13-33.

ASLAM, B. et al. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. **Infection and Drug Resistance**, v. 11, p. 1645, 2018.

AUGUSTYN et al. Essential Oil, Encyclopedia Britannica, Texto informativo, 2019. Disponível em: <https://www.britannica.com/topic/essential-oil>

AZHAR, S. N. A. S.; ASHARI, S. E.; SALIM, N. Development of a kojic monooleate-enriched oil-in-water nanoemulsion as a potential carrier for hyperpigmentation treatment. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 6465, 2018.

AZIZ, Z. A. A. et al. Essential oils: extraction techniques, pharmaceutical and therapeutic potential - a review. **Current Drug Metabolism**, v. 19, n. 13, p. 1100-1110, 2018.

BACHIEGA, T. F. et al. Immunomodulatory/anti-inflammatory effects of *Baccharis dracunculifolia* leaves. **Natural Product Research**, v. 27, n. 18, p. 1646-1650, 2013.

BACHIR, R. G.; BENALI, M. Antibacterial activity of the essential oils from the leaves of *Eucalyptus globulus* against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 9, p. 739, 2012.

BAJERSKI, L. et al. The use of Brazilian vegetable oils in nanoemulsions: an update on preparation and biological applications. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, n. 3, p. 347-363, 2016.

BÁNKUTI, S. M. S.; BÁNKUTI, F. I. Gestão ambiental e estratégia empresarial: um estudo em uma empresa de cosméticos no Brasil. **Gestão & Produção**, v. 21, n. 1, p. 171-184, 2014.

BAQUERO, Fernando; LEVIN, Bruce R. Proximate and ultimate causes of the bactericidal action of antibiotics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 2, p. 123-132, 2021.

BARBIERI, C.; BORSOTTO, P. Essential oils: market and legislation. In: Essential Oils, Publisher: IntechOpen, capítulo 6, p. 107-127, 2018. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/potential-of-essential-oils/essential-oils-market-and-legislation>

BARBOSA, L. N. et al. In vitro antibacterial and chemical properties of essential oils including native plants from Brazil against pathogenic and resistant bacteria. **Journal of Oleo Science**, p. 3-8, 2015.

BASER, K. H. C.; BUCHBAUER, G. Handbook of essential oils: science, technology and applications. 1ª ed., Publisher: CRC press, 991 p., 2015.

BEHR, M. et al. Insights into the molecular regulation of monolignol-derived product biosynthesis in the growing hemp hypocotyl. **BMC Plant Biology**, v. 18, n. 1, p. 2-18, 2018.

BELTRAME, J. et al. Photodegradation of essential oil from marjoram (*Origanum majorana* L.) studied by GC-MS and UV-VIS spectroscopy. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 41, n. 2, p. 81-88, 2013.

BEN BRAÏEK, O.; SMAOUI, S. *Enterococci*: between emerging pathogens and potential probiotics. **BioMed Research International**, p.1-13, 2019.

BEN-ARI, G.; LAVI, U. Marker-assisted selection in plant breeding. In: *Plant Biotechnology and Agriculture*. Publisher: Academic Press, p. 163-184, 2012.

BENFEY, P. N.; SCHERES, B. Arabidopsis as a model for systems biology. In: *Handbook of Systems Biology*. Publisher: Academic Press, p. 391-406, 2013.

BHARGAVA, S.; SAWANT, K. Drought stress adaptation: metabolic adjustment and regulation of gene expression. **Plant Breeding**, v. 132, n. 1, p. 21-32, 2013.

BIALA, W.; JASIŃSKI, M. The Phenylpropanoid case – it is transport that matters. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, n. 1610, p.1-8, 2018.

BILIA, A. R. et al. Essential oils loaded in nanosystems: a developing strategy for a successful therapeutic approach. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-14, 2014.

BLAIR, J. M. A et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42-51, 2014.

BLACKBURN, C. W.; MCCLURE, P. J. Pathogenic *Bacillus* species. In: **Foodborne Pathogens**. Woodhead Publishing, 2009. p. 844-888.

BOUHDID, S. et al. Investigation of functional and morphological changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *Origanum compactum* essential oil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 1558–1568, 2009.

BOUYAHYA, A. et al. Essential oils of *Origanum compactum* increase membrane permeability, disturb cell membrane integrity, and suppress quorum-sensing phenotype in bacteria. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 9, n. 5, p. 301-311, 2019.

BRASIL. *Baccharis* in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB5151>>.

BRASIL. Medidas de prevenção e controle da resistência microbiana e programa de uso racional de antimicrobianos em serviços de saúde - Módulo 3: Resistência bacteriana – Mecanismos e impacto clínico. Curso de Capacitação. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2007. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo4/objetivos.htm

BRITO, A. M. G. et al. Aromaterapia: da gênese a atualidade. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 4, p. 789-793, 2013.

BROCKSOM, T. J.; OLIVEIRA, K. T.; DESIDERÁ, A. L. The chemistry of the sesquiterpene alkaloids. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 6, p. 933-942, 2017.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. 2^a ed., Publisher: Wiley-Blackwell, 1280 p., 2015.

BURDUCEA, M. et al. Fertilization modifies the essential oil and physiology of basil varieties. **Industrial Crops and Products**, v. 121, p. 282-293, 2018.

BURLEC, A. F. et al. Ornamental *Asteraceae* species as new sources of secondary metabolites. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**, v. 51, n. 3, p. S425-S428, 2017.

BUSATO, N. V. et al. Estratégias de modelagem da extração de óleos essenciais por hidrodestilação e destilação a vapor. **Ciência Rural**, v. 44, n. 9, p. 1574-1582, 2014.

BUTNARIU, M.; SARAC, I. Essential oils from plants. **Journal of Biotechnology and Biomedical Science**, v. 1, n. 4, p. 35, 2018.

CALIXTO, J. B. The role of natural products in modern drug discovery. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, p. 01-07, 2019.

CAMPOS-GALVÃO, MARIA EMILENE MARTINO. Caracterização do mecanismo de sinalização por quorum sensing em *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis. Tese de Doutorado, 78 p., Universidade Federal de Viçosa, 2012.

CAMPOS, F. R.; BRESSAN, J.; JASINSKI, V. C. G.; ZUCCOLOTTO, T.; SILVA, L. E.; CERQUEIRA, L. B. *Baccharis (Asteraceae)*: chemical constituents and biological activities. **Chemical and Biodiversity**. v.13, p.1–17, 2016.

CANESCHI, C. A.; MARTINS, F. J.; LARRUDÉ, D. G.; ROMANI, E. C.; BRANDÃO, M. A. F.; RAPOSO, N. R. B. In vitro antifungal activity of *Baccharis trimera* Less (DC) essential oil against dermatophytes. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 11, p. 2083-2089, 2015.

CARACIOLO, F. B et al. Antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolates obtained from skin and soft tissue infections of outpatients from a university hospital in Recife-PE, Brazil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 87, n. 6, p. 857-861, 2012.

CASTELO, A. V. M.; DEL MENEZZI, C. H. S.; RESCK, I. S. Seasonal variation in the yield and the chemical composition of essential oils from two Brazilian native arbustive species. **Journal of Applied Sciences**, v. 12, n. 8, p. 753-760, 2012.

CAZELLA, L.N. et al. Antimicrobial activity of essential oil of *Baccharis dracunculifolia* DC (*Asteraceae*) aerial parts at flowering period. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, 2019.

CHAABAN, A. et al. Insecticide activity of *Baccharis dracunculifolia* essential oil against *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). **Natural Product Research**, England, v. 32, n. 24, p. 2954–2958, 2018.

CHAN, E. W. C. et al. Resveratrol and pterostilbene: a comparative overview of their chemistry, biosynthesis, plant sources, and pharmacological properties. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 9, n. 7, p. 124-129, 2019.

CHANDRASEKARA, A. Phenolic Acids. In: *Encyclopedia of Food Chemistry*, 1^a ed., Publisher: Elsevier, p. 535-545, 2019.

CHEZEM, W. R.; CLAY, N. K. Regulation of plant secondary metabolism and associated specialized cell development by MYBs and bHLHs. **Phytochemistry**, v. 131, p. 26-43, 2016.

CHIFIRIUC, C. et al. Hybrid magnetite nanoparticles/*Rosmarinus officinalis* essential oil nanobiosystem with antibiofilm activity. **Nanoscale Research Letters**, v. 7, n. 1, p. 209, 2012.

CHO, E. H.; LEE, M-Y.; HUR, M-H. The effects of aromatherapy on intensive care unit patients' stress and sleep quality: A nonrandomised controlled trial. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-11, 2017.

CHOUHAN, S.; SHARMA, K.; GULERIA, S. Antimicrobial activity of some essential oils - present status and future perspectives. **Medicines**, v. 4, n. 3, p. 2-21, 2017.

CHOUHAN, S.; SHARMA, K.; GULERIA, S. Antimicrobial activity of some essential oils - present status and future perspectives. **Medicines**, v. 4, n. 3, p. 2-21, 2017.

CLOECKAERT, A.; ZYGMUNT, M. S.; DOUBLET, B. Genetics of acquired antimicrobial resistance in animal and zoonotic pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 2428, 2017.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline M26-A Wayne, Pennsylvania, USA, 1999.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard, Eleventh Edition. CLSI document M02-A1, Wayne, Pennsylvania, USA, 2012.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, Tenth Edition. CLSI document M07-A10, Wayne, Pennsylvania, USA, 2015.

COELHO, J. P. M. Identificação e quantificação de compostos fenólicos em própolis da região sul do Brasil. Avaliação da atividade antioxidante por técnicas espectroscópicas e eletroquímicas, Tese de Mestrado, Universidade de Salamanca, Bragança, Portugal, 57 p., 2013.

CONG, Y.; YANG, S.; RAO, X. Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* infections: A review of case updating and clinical features. **Journal of Advanced Research**, v. 21, p. 169-176, 2020.

COX, G.; WRIGHT, G. D. Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, n. 6-7, p. 287-292, 2013.

DAGHBOUCHE, S. et al. Effect of phenological stages on essential oil composition of *Cytisus triflorus* L'Her. **Journal of King Saud University-Science**, v. 32, n. 4, p. 2383-2387, 2020.

DAMACENO, N. B.; FARIAS, L. R. Relação existente entre biofilmes bacterianos, quorum sensing, infecções e resistência a antibióticos: uma revisão bibliográfica. **Revista Brasileira de Pesquisa em Ciências da Saúde**, v. 3, n. 1, p. 46-51, 2016.

DANAEI, M. et al. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, p. 57, 2018.

DUARTE, J. L. et al. Evaluation of larvicidal activity of a nanoemulsion of *Rosmarinus officinalis* essential oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 2, p. 189-192, 2015.

DE SOUZA, E. L. et al. Influence of *Origanum vulgare* L. essential oil on enterotoxin production, membrane permeability and surface characteristics of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**. v. 137, p. 308–311, 2010.

DEAN, C. R.; DE PASCALE, G.; BENTON, B. Resistance of Gram-negative *Bacilli* to Antimicrobials. In: **Antimicrobial Resistance in the 21st Century**. Springer, Cham, 2018. p. 71-162.

DELAZAR, A. et al. Microwave-assisted extraction in natural products isolation. In: **Natural products isolation**. Publisher: Humana Press, p. 89-115, 2012.

DENG, Y.; LU, S. Biosynthesis and regulation of phenylpropanoids in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 36, n. 4, p. 257-290, 2017.

DHIFI, W. et al. Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: a critical review. **Medicines**, v. 3, n. 25, p. 2-16, 2016.

DIAO, W-R. et al. Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare Mill.*). **Food Control**, v. 35, n. 1, p. 109-116, 2014.

DOCIMO, T. et al. Early phenylpropanoid biosynthetic steps in *Cannabis sativa*: link between genes and metabolites. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 7, p. 13626-13644, 2013.

DOS SANTOS, N. P.; PINTO, A. C. “A Mata é sua Farmácia” – A Pesquisa de Plantas Brasileiras para o Combate de Doenças Tropicais no Século XIX. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 2, p. 162-172, 2012.

EBRAHIMI, A. et al. Effects of temperature and varieties on essential oil content and quantity features of chamomile. **Journal of Agricultural Extension and Rural Development**, v. 3, n. 2, p. 19-22, 2011.

ECHEVERRÍA, J.; ALBUQUERQUE, R. D. D. G. Nanoemulsions of essential oils: New tool for control of vector-borne diseases and in vitro effects on some parasitic agents. **Medicines**, v. 6, n. 2, p. 42, 2019.

EL-EKIABY, W. T. Basil oil nanoemulsion formulation and its antimicrobial activity against fish pathogen and enhance disease resistance against *Aeromonas hydrophila* in cultured Nile tilapia. **Egyptian Journal for Aquaculture**, v. 9, n. 4, p. 13-33, 2019.

EL-SAYED, Samah M.; EL-SAYED, Hoda S. Antimicrobial nanoemulsion formulation based on thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil for UF labneh preservation. **Journal of Materials Research and Technology**, v. 10, p. 1029-1041, 2021.

EL-TAYEB, M. A. et al. Prevalence, serotyping and antimicrobials resistance mechanism of *Salmonella enterica* isolated from clinical and environmental samples in Saudi Arabia. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 499-508, 2017.

FABRI, R. L. et al. Potencial antioxidante e antimicrobiano de espécies da família *Asteraceae*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 2, p. 183-189, 2011.

FAGUNDES, M.; FERNANDES, W. G. Insect herbivores associated with *Baccharis dracunculifolia* (*Asteraceae*): responses of gall-forming and free-feeding insects to latitudinal variation. **Revista de Biologia Tropical**, v. 59, n. 3, p. 1419-1432, 2011.

FALEIRO, M. L. The mode of antibacterial action of essential oils. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances, v. 2, p. 1143-1156, 2011.

FARMACOPEIA EUROPEIA. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, 8ª Edição, 2013.

FELIPE, L. O.; BICAS, J. L. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Química Nova Escola**, v. 39, n. 2, p. 120-130, 2017.

FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; VIUDA-MARTOS, M. Introduction to the special issue: application of essential oils in food systems. **Foods**, v. 7, n. 56, p. 2-4 2018.

FIGUEIREDO, A. C.; PEDRO, L. G.; BARROSO, J G. Plantas aromáticas e mediciniais - óleos essenciais e voláteis. **Revista da APH**, n. 114, p. 29-33, 2014.

FILE JR, T. M.; SRINIVASAN, A.; BARTLETT, J. G. Antimicrobial stewardship: importance for patient and public health. **Clinical Infectious Diseases**, v. 59, n. 3, p. S93-S96, 2014.

FIOCRUZ. Introdução à Gestão da Inovação em Medicamentos da Biodiversidade. Fundação Oswaldo Cruz. Material para estudo. 2018. Disponível em: <https://mooc.campusvirtual.fiocruz.br/rea/medicamentos-da-biodiversidade/index.html>

FOKOU, J. B. H.; DONGMO, P. M. J.; BOYOM, F. F. Essential oil's chemical composition and pharmacological properties. *Essential Oils: Oils of Nature*, v. 13, p. 13, El-Shemy: IntechOpen, 2020. Available from: <https://www.intechopen.com/books/essential-oils-oils-of-nature/essential-oil-s-chemical-composition-and-pharmacological-properties>

FOSTER, T. J. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*: Current status and future prospects. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. 3, p. 430-449, 2017.

FRANGIOTE-PALLONE, S.; DE SOUZA, L. A. Pappus and cypsela ontogeny in *Asteraceae*: structural considerations of the tribal category. **Revista Mexicana de Biodiversidad**, v. 85, n. 1, p. 62-77, 2014.

GAURAB, R. et al. Nanomedicine: therapeutic applications and limitations. In: *Handbook of Research on Diverse Applications of Nanotechnology in Biomedicine, Chemistry, and Engineering*. IGI Global, 2015. p. 64-89.

GAVAHIAN, M., FARHOOSH, R.; FARAHNAKY, A.; JAVIDNIA, K.; SHAHIDI, F. Comparison of extraction parameters and extracted essential oils from *Mentha piperita* L. using hydrodistillation and steam distillation. **International Food Research Journal**, v. 22, p. 283–288, 2015.

GELLATLY, S. L.; HANCOCK, R. E. W. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. **Pathogens and Disease**, v. 67, n. 3, p. 159-173, 2013.

GHADERI, L. et al. Development of antimicrobial nanoemulsion-based delivery systems against selected pathogenic bacteria using a thymol-rich *Thymus daenensis* essential oil. **Journal of applied microbiology**, v. 123, n. 4, p. 832-840, 2017.

GILL, S.S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 909-930, 2010.

GLASSET, B. et al. *Bacillus cereus*, a serious cause of nosocomial infections: epidemiologic and genetic survey. **PLoS One**, v. 13, n. 5, p. e0194346, 2018.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GOBBO-NETO, L. et al. Spatial and temporal variations in secondary metabolites content of the Brazilian arnica leaves (*Lychnophora ericoides* Mart., Asteraceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 12, p. 2382-2390, 2017.

GRDC. Plant and growth physiology. Grains Research and Development Corporation. Texto Informativo. 2018. Disponível em: https://grdc.com.au/_data/assets/pdf_file/0028/366184/GrowNote-Lentil-South-6-Plant-Growth-Physiology.pdf

GRIFFITH, M.; YAISH, M.W. Antifreeze proteins in overwintering plants: A tale of two activities. **Trends in Plant Science**, v. 9, p. 399–405, 2004.

GUARDIA, M.; ARMENTA, S. Greening sample treatments. In: *Comprehensive Analytical Chemistry*. Publisher: Elsevier, p. 87-120, 2011.

GUIMARÃES, N. S. S. et al. *Baccharis dracunculifolia*, the main source of green propolis, exhibits potent antioxidant activity and prevents oxidative mitochondrial damage. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 3-4, p. 1091-1097, 2012.

GUPTA, A. et al. Nanoemulsions: formation, properties and applications. **Soft Matter**, v. 12, n. 11, p. 2826-2841, 2016.

GUPTA, S.; VARIYAR, P. S. Nanoencapsulation of essential oils for sustained release: application as therapeutics and antimicrobials. In: Encapsulations. Academic Press, 2016. p. 641-672.

GURPREET, K.; SINGH, S. K. Review of nanoemulsion formulation and characterization techniques. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 80, n. 5, p. 781-789, 2018.

HASSANSHAHIAN, M.; SAADATFAR, A.; MASOUMIPOUR, F. Formulation and characterization of nanoemulsion from *Alhagi maurorum* essential oil and study of its antimicrobial, antibiofilm, and plasmid curing activity against antibiotic-resistant pathogenic bacteria. **Journal of Environmental Health Science and Engineering**, v. 18, n. 2, p. 1015-1027, 2020.

HASSANZADEH, H.; ALIZADEH, M.; BARI, M. R. Formulation of garlic oil-in-water nanoemulsion: antimicrobial and physicochemical aspects. **IET Nanobiotechnology**, v. 12, n. 5, p. 647-652, 2018.

HAENNI, M.; LUPO, A.; MADEC, J. Y. Antimicrobial Resistance in *Streptococcus* spp. **Antimicrobial Resistance in Bacteria from Livestock and Companion Animals**, p. 159-184, 2018.

HAFEDH, H. et al. Effect of *Mentha longifolia* L. ssp *longifolia* essential oil on the morphology of four pathogenic bacteria visualized by atomic force microscopy. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, p. 1122–1127, 2010.

HANGARTER, P. Plants in Motion. Indiana University. Texto Informativo. 2000. Disponível em: <https://plantsinmotion.bio.indiana.edu/plantmotion/vegetative/veg.html>

HASHEM, A. S. et al. *Pimpinella anisum* essential oil nanoemulsions against *Tribolium castaneum* - insecticidal activity and mode of action. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 19, p. 18802-18812, 2018.

HASSIOTIS, C. N. et al. Environmental and developmental factors affect essential oil production and quality of *Lavandula angustifolia* during flowering period. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 359-366, 2014.

HEALY, E. F. et al. A unified mechanism for plant polyketide biosynthesis derived from in silico modeling. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 497, n. 4, p. 1123-1128, 2018.

HEER, A.; GULERIA, S.; RAZDAN, V.K. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities and characterization of bioactive compounds from essential oil of *Cinnamomum tamala* grown in north-western Himalaya. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 26, p. 191–198, 2017.

HENDERSON, S. Stilbene: Derivatives, Applications and Research. 1^a ed., Publisher: Nova Science Pub Inc, 88 p., 2017.

HOLMES, A. H. et al. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. **The Lancet**, v. 387, n. 10014, p. 176-187, 2016.

HU, W. et al. Antibacterial activity and mechanism of *Litsea cubeba* essential oil against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Industrial Crops and Products**, v. 130, p. 34-41, 2019.

HUSSAIN, M. S. et al. Current approaches toward production of secondary plant metabolites. **Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences**, v. 4, n. 1, p. 10-20, 2012.

IMPA, S. M.; NADARADJAN, S.; JAGADISH, S. V. K. Drought stress induced reactive oxygen species and antioxidants in plants. In: *Abiotic Stress Responses in Plants*. New York: Springer, p. 131-147, 2012.

INOUE, S.; UCHIDA, K.; MARUYAMA, N.; YAMAGUCHI, H.; ABE, S. A novel method to estimate the contribution of the vapor activity of essential oils in agar diffusion assay. **Japanese Journal of Medical Micology**, v.47, n.2, 2006.

IREDELL, J.; BROWN, J.; TAGG, K. Antibiotic resistance in *Enterobacteriaceae*: mechanisms and clinical implications. **BMJ**, v. 352, p.1-19, 2016.

JAIN, P. K.; JOSHI, H. Coumarin: chemical and pharmacological profile. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 2, n. 6, p. 236-240, 2012.

JANNUZZI, H. et al. Avaliação agronômica e química de dezessete acessos de erva-cidreira [*Lippia alba* (Mill.) NE Brown] - quimiotipo citral, cultivados no Distrito Federal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, n.3, p.258-264, 2011.

JAFARI, S. M.; MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions: formulation, applications, and characterization. Academic Press, 2018.

JOHANN, S. et al. Activity of compounds isolated from *Baccharis dracunculifolia* DC (*Asteraceae*) against *Paracoccidioides brasiliensis*. **Medical Mycology**, v. 50, n. 8, p. 843-851, 2012.

JOO, E. J.; CRESS, B. F.; KOFFAS, M. A. G. Using recombinant microorganisms for the synthesis and modification of flavonoids and stilbenes. In: Polyphenols in Human Health and Disease. Publisher: Academic Press, p. 483-488, 2014.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLONGG, E. A.; STEENS, P. F.; DONOGUE, M. J. Sistemática vegetal: um enfoque filogenético. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 612p., 2009.

KALAIVANI, R. et al. Antimicrobial activity of some important medicinal plant oils against human pathogens. **Journal of Biologically Active Products from Nature**, v. 2, n. 1, p. 30-37, 2012.

KALEEM, M.; AHMAD, A. Flavonoids as nutraceuticals. In: Therapeutic, probiotic, and unconventional foods. Publisher: Academic Press, p. 137-155, 2018.

KARAM, T. K. et al. Carqueja (*Baccharis trimera*): utilização terapêutica e biossíntese. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 2, p. 280-286, 2013.

KHAN, F. A. Synthesis of Nanomaterials: Methods & Technology. In: Applications of Nanomaterials in Human Health. Springer, Singapore, 2020. p. 15-21.

KHAYYAT, S. A.; ROSELIN, L. S. Recent progress in photochemical reaction on main components of some essential oils. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 22, n. 7, p. 855-875, 2018.

KIRUTHIGA, A.; KRISHNAKUMAR, T.; KANNAN, R. The effect of surfactant on structural and optical properties of ZnO nanorods by wet chemical synthesis. In: AIP Conference Proceedings. AIP Publishing LLC, 2019. p. 150017.

KIM, J. K.; PARK, S. U. A recent overview on the biological and pharmacological activities of ferulic acid. **EXCLI journal**, v. 18, p. 132-138, 2019.

KISHOREKUMAR, R. et al. An overview of important enzymes involved in nitrogen assimilation of plants. In: Nitrogen Metabolism in Plants. New York: Humana, p. 1-13, 2020.

KNAAK, N.; FIUZA, L. M. Potencial dos óleos essenciais de plantas no controle de insetos e microrganismos, **Neotropical Biology and Conservation**, v. 5, n. 2, p. 120-132, 2010.

KUBRAK, T.; PODGÓRSKI, R.; STOMPOR, M. Natural and synthetic coumarins and their pharmacological activity. **European Journal of Clinical and Experimental Medicine**, n. 2, p. 169-175, 2017.

KUETE, V. Medicinal spices and vegetables from Africa: therapeutic potential against metabolic, inflammatory, infectious, and systemic diseases, 1^a ed., Publisher: Academic Press, 694 p., 2017.

KUMAR, A.; DIXIT, C. K. Methods for characterization of nanoparticles. In: Advances in nanomedicine for the delivery of therapeutic nucleic acids. Woodhead Publishing, 2017. p. 43-58.

KUMAR, I.; SHARMA, R. K. Production of secondary metabolites in plants under abiotic stress: an overview. **Significances of Bioengineering and Bioscience**, v. 2, p. 1-5, 2018.

KUMAR, N.; GOEL, N. Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. **Biotechnology Reports**, v. 24, p. e00370, 2019.

KUNDU, A. Vanillin biosynthetic pathways in plants. **Planta**, v. 245, n. 6, p. 1069-1078, 2017.

KURDELAS, R. R. et al. Chemical composition, anti-insect, and antimicrobial activity of *Baccharis darwinii* essential oil from Argentina, Patagonia. **Industrial Crops and Products**, v.40, p. 261-267, 2012.

LA STORIA, A. et al. Atomic force microscopy analysis shows surface structure changes in carvacrol - treated bacterial cells. **Research in Microbiology**, v. 162, p. 164–172, 2011.

LAGE, T. C. et al. Chemical composition and acaricidal activity of the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* De Candolle (1836) and its constituents nerolidol and limonene on larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, v. 148, p. 24-29, 2015.

LAHLOU, M. Screening of natural products for drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 2, n. 5, p. 697-705, 2007.

LAMBERT, R. J. W. et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 453–462, 2001.

LAMIEN-MEDA, A.; SCHMIDERER, C.; LOHWASSER, U.; BÖRNER, A.; FRANZ, C.; NOVAK, J. Variability of the essential oil composition in the sage collection of the Genebank Gatersleben: a new viridiflorol chemotype. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, n. 2, p. 75-82, 2010.

LEE, J. Y. et al. Antibacterial and antioxidant properties of hydroxypropyl methylcellulose-based active composite films incorporating oregano essential oil nanoemulsions. **LWT Food Science and Technology**, v. 106, p. 164-171, 2019.

LEITE, E. L.; TOUGUINHA, H.; FRANÇA, R. F. Considerações biomédicas sobre a própolis verde de Minas Gerais. Texto para Discussão. 2018. Disponível em: http://portal.unisepe.com.br/unifia/wp-content/uploads/sites/10001/2018/06/055_consideracoes_biomedicas.pdf

LIMA, V. A. et al. Growth, photosynthetic pigments and production of essential oil of long-pepper under different light conditions. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 2, p. 1167-1174, 2017.

LIN, L. et al. Enhancing stability of *Eucalyptus citriodora* essential oil by solid nanoliposomes encapsulation. **Industrial Crops and Products**, v. 140, p. 111615, 2019.

LOUREIRO, R. J. et al. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, v. 34, n. 1, 2016.

LU, W-C. et al. Preparation, characterization, and antimicrobial activity of nanoemulsions incorporating citral essential oil. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 26, n. 1, p. 82-89, 2018.

LUZ, J. M. Q. et al. Produção de óleo essencial de *Melissa officinalis* L. em diferentes épocas, sistemas de cultivo e adubações. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 3, p. 552-560, 2014.

LYRA, L. P. S. Desenvolvimento de nanoemulsão de geraniol e óleo essencial da palmarosa (*Cymbopogon martinii*) e sua ação inibitória sobre linhagens de *Cutibacterium acnes*. (Tese de Mestrado), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus Botucatu/SP, 2019.

MAGI, G.; MARINI, E.; FACINELLI, B. Antimicrobial activity of essential oils and carvacrol and synergy of carvacrol and erythromycin, against clinical, erythromycin-resistant Group A *Streptococci*. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 165, p. 1-7, 2015.

MAHIZAN, N. A. et al. Terpene derivatives as a potential agent against antimicrobial resistance (AMR) pathogens. **Molecules**, v. 24, n. 14, p. 2-21, 2019.

MAHON, C. R.; MANUSELIS, G. Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th Edition. 2018.

MANSOORI, G. A. An introduction to nanoscience and nanotechnology. In: Nanoscience and Plant–Soil Systems. Springer, 2017. p. 3-20.

MATSOUKAS, I. G. Attainment of reproductive competence, phase transition, and quantification of juvenility in mutant genetic screens. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. 32, p. 1-5, 2014.

MCCREATH, S. B.; DELGODA, R. Pharmacognosy: Fundamentals, applications, and strategies. 1^a ed., Publisher: Academic Press, 738 p., 2017.

MCETIN, B.; CAKMAKCI, S.; CAKMAKCI, R. The investigation of antimicrobial activity of thyme and oregano essential oils. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v. 35, p. 145–154, 2011.

MEDEIROS, F. C. M. Caracterização química e atividade biológica de óleos essenciais de plantas do Cerrado contra fungos xilófagos. 108 p., Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, 2014.

METIN, Z. et al. Aromatherapy massage for neuropathic pain and quality of life in diabetic patients. **Journal of Nursing Scholarship**, v. 49, n. 4, p. 379-388, 2017.

MICHALAK, M. Aromatherapy and methods of applying essential oils. **Archives of Physiotherapy and Global Researches**, v. 22, n. 2, p. 25-31, 2018.

MIGUEL, L. M. Tendências do uso de produtos naturais nas indústrias de cosméticos da França. **Revista Geográfica de América Central**, v. 2, p. 1-15, 2011.

MILLER, W. R.; MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of antibiotic resistance in *enterococci*. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 12, n. 10, p. 1221-1236, 2014.

MIRANDA, C. A. S. F. et al. Essential oils from leaves of various species: antioxidant and antibacterial properties on growth in pathogenic species. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 1, p. 213-220, 2016.

MOGHADDAM, M.; MEHDIZADEH, L. Chemistry of essential oils and factors influencing their constituents. In: *Soft Chemistry and Food Fermentation*. Publisher: Academic Press, p. 379-419, 2017.

MOGHIMI, R. et al. Superior antibacterial activity of nanoemulsion of *Thymus daenensis* essential oil against *E. coli*. **Food Chemistry**, v. 194, p. 410-415, 2016.

MOHAMMADHOSSEINI, M. et al. Chemical composition of the essential oil from flowers, leaves and stems of *Haplophyllum perforatum* by using head space solid phase microextraction. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 15, n. 4, p. 506-515, 2012.

MORADI, S.; BARATI, A. Essential oils nanoemulsions: preparation, characterization, and study of antibacterial activity against *Escherichia coli*. **International Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 15, n. 3, p. 199-210, 2019.

MOREIRA, M.C.H; VIEIRA, A.S.C. Efeito da adubação mineral e do estresse hídrico sobre a produção de biomassa e óleos essenciais da citronela de java (*Cymbopogon winterianus* jowitt ex bor). **Vozes do Vale**, n.8, p. 1-20, 2015.

MORGAN, J. B.; CONNOLLY, E. L. Plant-Soil interactions: nutrient uptake. nature education knowledge. Texto Informativo. 2013. Disponível em: <https://www.nature.com/scitable/knowledge/library/plant-soil-interactions-nutrient-uptake-105289112/>

MOSES, T.; GOOSSENS, A. Plants for human health: greening biotechnology and synthetic biology. **Journal of Experimental Botany**, v. 68, n. 15, p. 4009-4011, 2017.

MUKHERJEE, P. K. Quality Control and Evaluation of Herbal Drugs: Evaluating Natural Products and Traditional Medicine. Publisher: Elsevier, 2019.

NAEEM, A. et al. Essential oils: Brief background and uses. **Annals of Short Reports**, v. 1, n. 1, p. 1006, 2018.

NARAWI, M. et al. Biocompatible nutmeg oil-loaded nanoemulsion as phyto-repellent. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 214, 2020.

NAJAFIAN, S. Storage conditions affect the essential oil composition of cultivated *Balm Mint* Herb (*Lamiaceae*) in Iran. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 575-581, 2014.

NAZZARO, F. et al. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 12, p. 1451-1474, 2013.

NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; COPPOLA, R. Quorum sensing and phytochemicals. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 6, p. 12607-12619, 2013.

NEGREIROS, D. et al. Growth-survival tradeoff in the widespread tropical shrub *Baccharis dracunculifolia* (*Asteraceae*) in response to a nutrient gradient. **Tropical Ecology**, v. 55, n. 2, p. 167-176, 2014.

NEGREIROS, M. O. et al. Antimicrobial and antibiofilm activity of *Baccharis psiadioides* essential oil against antibiotic-resistant *Enterococcus faecalis* strains. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 12, p. 3272-3279, 2016.

NEILSON, A. P.; GOODRICH, K. M.; FERRUZZI, M. G. Bioavailability and metabolism of bioactive compounds from foods. In: *Nutrition in the Prevention and Treatment of Disease*. Publisher: Academic Press, p. 301-319, 2017.

NGUEFACK, J.; BUDDE, B. B.; JAKOBSEN, M. Five essential oils from aromatic plants of *Cameroon*: their antibacterial activity and ability to permeabilize the cytoplasmic membrane of *Listeria innocua* examined by flow cytometry. **Letters in Applied Microbiology**, v. 39, p. 395-400, 2004.

NIRMALA, M. J. et al. Preparation of celery essential oil-based nanoemulsion by ultrasonication and evaluation of its potential anticancer and antibacterial activity. **International Journal of Nanomedicine**, v. 15, p. 7651, 2020.

NRCCA. Soil fertility and nutrient management – Study Guide. American Society of Agronomy. Texto Informativo. Disponível em: <https://nrcca.cals.cornell.edu/nutrient/CA5/CA0539.php>

O'CONNELL, K. M. G et al. Combating multidrug-resistant bacteria: current strategies for the discovery of novel antibacterials. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 52, n. 41, p. 10706-10733, 2013.

O'SHAUGHNESSY, S. A.; RUSH, C. Precision agriculture: irrigation. In: Encyclopedia of Agriculture and Food Systems, 2ª Ed., Publisher: Academic Press, p. 521-535, 2014.

OLIVEIRA, R. N.; REHDER, V. L. G.; OLIVEIRA, A. S. S.; JERALDO, V. D. L. S.; LINHARES, A. X.; ALLEGRETTI, S. M. Anthelmintic activity in vitro and in vivo of *Baccharis trimera* (Less) DC against immature and adult worms of *Schistosoma mansoni*. **Experimental Parasitology**, v. 139, p. 63-72, 2014a.

OLIVEIRA, T. A. et al. *Baccharis dracunculifolia* with high levels of phenol compounds reduces blood glucose in healthy human. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 8, n. 24, p. 670-673, 2014b.

OMOBOLANLE, A. E.; OGHENEKOME, O. H.; CRAKER, L. E. Growth and essential oil yield of African basil, *Ocimum gratissimum*, under light and water stress. **Journal of Medicinally Active Plants**, v. 1, n. 4, p. 143-149, 2013.

OMS. Organização Mundial de Saúde. Não há tempo a perder: acautelar o futuro contra infecções resistentes aos medicamentos - Relatório para o secretário geral das Nações Unidas: resumo das recomendações e mensagens-chave. 2019. Disponível em: https://www.who.int/antimicrobial-resistance/interagency-coordination-group/IACG_final_summary_PT.pdf?ua=1

ONO, N. N. et al. Two UGT84 family glycosyltransferases catalyze a critical reaction of hydrolyzable tannin biosynthesis in pomegranate (*Punica granatum*). **PloS one**, v. 11, n. 5, p. e0156319, 2016.

PADALIA, R. C. et al. Changes in aroma profiles of 11 Indian *Ocimum* taxa during plant ontogeny. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, n. 8, p. 2567-2587, 2013.

PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: an overview. **Journal of Nutritional Science**, v. 5, n. e46, p. 1-15, 2016.

PANKEY, G. A.; SABATH, L. D. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 6, p. 864-870, 2004.

PARIZOTTO, A. V. et al. Lignificação de raízes de soja (*Glycine max L. Merril*) submetidas ao aleloquímico 2-benzoxazolinona, Anais Eletrônico, VII EPCC, Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar, Centro Universitário de Maringá, Maringá: CESUMAR, 2011.

PARREIRA, N. A. et al. Antiprotozoal, schistosomicidal and antimicrobial activities of the essential oil from the leaves of *Baccharis dracunculifolia*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 7, n. 4, p. 993-1001, 2010.

PARTRIDGE, S. R. Resistance mechanisms in *Enterobacteriaceae*. **Pathology**, v. 47, n. 3, p. 276-284, 2015.

PAUL, S. *Trachyspermum ammi* (L.) fruit essential oil influencing on membrane permeability and surface characteristics in inhibiting foodborne pathogens. **Food Control**, v. 22, p. 725-731, 2011.

PAUTER, K.; SZULTKA-MŁYŃSKA, M.; BUSZEWSKI, B. Determination and identification of antibiotic drugs and bacterial strains in biological samples. **Molecules**, v. 25, n. 11, p. 2556, 2020.

PAVONI, L. et al. An overview of micro-and nanoemulsions as vehicles for essential oils: Formulation, preparation, and stability. **Nanomaterials**, v. 10, n. 1, p. 135, 2020.

PEREIRA, C. A. et al. Antibacterial activity of *Baccharis dracunculifolia* in planktonic cultures and biofilms of *Streptococcus mutans*. **Journal of Infection and Public Health**, England, v. 9, n. 3, p. 324–330, 2016.

PERIASAMY, V. S.; ATHINARAYANAN, J.; ALSHATWI, A. A. Anticancer activity of an ultrasonic nanoemulsion formulation of *Nigella sativa* L. essential oil on human breast cancer cells. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 31, p. 449-455, 2016.

PERVEEN, S.; AL-TAWEEL, A. Introductory chapter: terpenes and terpenoids. In: *Terpenes and Terpenoids*. Publisher: IntechOpen, p. 1-12, 2018. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/terpenes-and-terpenoids/introductory-chapter-terpenes-and-terpenoids>

PES, L. Z.; ARENHARDT, M. H. A. H. Caderno Didático de Fisiologia Vegetal. **Cadernos Pronatec Goiás**, v. 1, n. 1, p. 386-378, 2018.

PETERSON, E.; KAUR, P. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2928, 2018.

POTT, D. M.; OSORIO, S.; VALLARINO, J. G. From central to specialized metabolism: an overview of some secondary compounds derived from the primary metabolism for their role in conferring nutritional and organoleptic characteristics to fruit. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p.1-19, 2019.

PRAKASH, A. et al. Effect of nanoemulsification on the antibacterial and anti-biofilm activities of selected spice essential oils and their major constituents against *Salmonella enterica* Typhimurium. **Journal of Cluster Science**, p. 1-13, 2019.

PROCHNOW, D. et al. Crescimento, produção e qualidade do óleo essencial de *Aloysia triphylla* em função da disponibilidade hídrica e sazonalidade. 56 p. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), 2015.

PRUSKI, J. F.; ROBINSON, H. Flora Mesoamericana, *Asteraceae*, 1^a Ed., St. Louis: Missouri Botanical Garden Press, 632 p., 2018.

RADAELLI, M. et al. Antimicrobial activities of six essential oils commonly used as condiments in Brazil against *Clostridium perfringens*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 424–430, 2016.

RAĖBETLI, C. et al. Evaluation of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* isolates by years. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, p.1-4, 2016.

RASSEM, H. H. A.; NOUR, A. H.; YUNUS, R. M. Techniques for extraction of essential oils from plants: a review. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 10, n. 16, p. 117-127, 2016.

REHMAN, R. et al. Biosynthesis of essential oils in aromatic plants: A review. **Food Reviews International**, v. 32, n. 2, p. 117-160, 2016b.

REHMAN, R. et al. Biosynthetic factories of essential oils: the aromatic plants. **Natural Products Chemistry & Research**, v. 4, n. 4, p. 3-11, 2016a.

REYGAERT, W. C. Antimicrobial Mechanisms of *Escherichia coli*. In: Recent Advances on Physiology, Pathogenesis and Biotechnological Applications. IntechOpen, p. 81-97, London, UK. 2017.

REZAIRE, A. et al. Amazonian palm *Oenocarpus bataua* (“patawa”): Chemical and biological antioxidant activity–Phytochemical composition. **Food Chemistry**, v. 149, p. 62-70, 2014.

RODRIGUES, J. L. et al. Heterologous production of caffeic acid from tyrosine in *Escherichia coli*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 71, p. 36-44, 2015.

ROQUE, N.; BAUTISTA, H. P. *Asteraceae*: caracterização e morfologia floral. Salvador: EDUFBA, 71 p. 2008.

SADGROVE, N.; JONES, G. A contemporary introduction to essential oils: chemistry, bioactivity and prospects for Australian agriculture. **Agriculture**, v. 5, n. 1, p. 48-102, 2015.

SAEB, K.; GHOLAMREZAEI, S. Variation of essential oil composition of *Melissa officinalis* L. leaves during different stages of plant growth. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 2, p. S547-S549, 2012.

SALAZAR, J. J. T. et al. Phytochemical characterization of the *Baccharis dracunculifolia* DC (*Asteraceae*) essential oil and antibacterial activity evaluation. **Industrial Crops & Products**, v. 122, p. 591–595, 2018

SALMINEN, J-P.; KARONEN, M. Chemical ecology of tannins and other phenolics: we need a change in approach. **Functional Ecology**, v. 25, n. 2, p. 325-338, 2011.

SÁNCHEZ, E.; GARCÍA, S.; HEREDIA, N. Extracts of edible and medicinal plants damage membranes of *Vibrio cholerae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 6888–6894, 2010.

SANTANA, H. C. D. Caracterização química do óleo essencial de *Baccharis reticularia* D.C. (*Asteraceae*) em função de diferentes procedências e da sazonalidade no Distrito Federal. Dissertação de mestrado. Universidade de Brasília. 2013. Disponível em: <https://repositorio.unb.br/handle/10482/15456>

SANTOS, R. F. et al. Composição química e produtividade dos principais componentes do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* DC. em função da adubação orgânica. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, p. 224-234, 2012.

SÃO PEDRO, A. et al. The use of nanotechnology as an approach for essential oil-based formulations with antimicrobial activity. **Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them.**, v. 2, p. 1364-1374, 2013.

SARKER, S. D.; NAHAR, L.; KUMARASAMY, Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. **Methods**, v. 42, n. 4, p. 321-324, 2007.

SARKIC, A.; STAPPEN, I. Essential oils and their single compounds in cosmetics - A critical review. **Cosmetics**, v. 5, n. 1, p. 11, 2018.

SARTOR, R. B. Modelagem, simulação e otimização de uma unidade industrial de extração de óleos essenciais por arraste a vapor. Tese de Mestrado, 75 p., Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.

SAVOIA, D. Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. **Future Microbiology**, v. 7, n. 8, p. 979-990, 2012.

SCHMIDT, E. Production of essential oils. In: Handbook of essential oils: Science, Technology and applications. EUA: Taylor and Francis Group. p. 83-118, 2010.

SCHNEIDER, A. A. Estudo taxonômico de *Baccharis* L. sect. *Caulopterae* DC. (*Asteraceae: Astereae*) no Brasil. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 197 p., 2009.

SHNOUDEH, A. J. et al. Synthesis, characterization, and applications of metal nanoparticles. In: **Biomaterials and Bionanotechnology**. Academic Press, 2019. p. 527-612.

SCHOSSLER, P. et al. Volatile compounds of *Baccharis punctulata*, *Baccharis dracunculifolia* and *Eupatorium laevigatum* obtained using solid phase microextraction and hydrodistillation. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 2, p. 277-87, 2009.

SCHREINER, M. et al. UV-B-induced secondary plant metabolites-potential benefits for plant and human health. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 31, n. 3, p. 229-240, 2012.

SCHWARZ, S.; LOEFFLER, A.; KADLEC, K. Bacterial resistance to antimicrobial agents and its impact on veterinary and human medicine. **Advances in Veterinary Dermatology**, v. 8, p. 95-110, 2017.

SEIBERT, J. B. et al. Seasonality study of essential oil from leaves of *Cymbopogon densiflorus* and nanoemulsion development with antioxidant activity. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 34, n. 1, p. 5-14, 2018.

SEUGLING, J. et al. Development of *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) essential oil nanoemulsion and its biological activity on pre-pupae of *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). **Journal Pharmacy Pharmacology**, v. 7, p. 293-308, 2019.

SFORCIN, J. M. et al. *Baccharis dracunculifolia*: Uma das principais fontes vegetais da própolis brasileira. São Paulo: Editora UNESP, 38 p., 2012.

SHAMLOO, M. et al. Effects of genotype and temperature on accumulation of plant secondary metabolites in Canadian and Australian wheat grown under controlled environments. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-13, 2017.

SHETH, T. et al. Multiple nanoemulsions. **Nature Reviews Materials**, v. 5, n. 3, p. 214-228, 2020.

SI SAIDA, Z.B. et al. Essential oils composition, antibacterial and antioxidant activities of hydro distilled extract of *Eucalyptus globulus* fruits. **Industrial Crops & Products**, v. 89, p. 167-175, 2016.

SIDDIQUI, A. A. et al. Role of natural products in drug discovery process. **International Journal of Drug Development and Research**, v. 6, n. 2, p. 172-204, 2014.

SINGH, Yuvraj et al. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. **Journal of controlled release**, v. 252, p. 28-49, 2017.

SIMAS, N.K. et al. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue – atividade larvívica de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. **Química Nova**, v. 27, p. 46-49, 2004.

SIMPSON, B. B. Economic importance of *Compositae*. In: FUNK, V. A et al. Systematics, Evolution and Biogeography of *Compositae*. Vienna: IAPT, 2009.

SOMMER, M. O. A et al. Prediction of antibiotic resistance: time for a new preclinical paradigm? **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 11, p. 689-696, 2017.

SOUZA, C. F. et al. Nanotechnology improves the therapeutic efficacy of *Melaleuca alternifolia* essential oil in experimentally infected *Rhamdia quelen* with *Pseudomonas aeruginosa*. **Aquaculture**, v. 473, p. 169-171, 2017.

SOUZA et al. Influência do horário de coleta, orientação geográfica e dossel na produção de óleo essencial de *Cordia verbenacea* DC. **Biotemas**, v. 24, n. 1, p. 9-14, 2011.

SOUSA, R. F.; SOUSA, J. A. Metabólitos secundários associados a estresse hídrico e suas funções nos tecidos vegetais. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental**, v. 11, n. 1, p. 01-08, 2017.

SOUZA, T. S. B. Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro de óleo essencial de alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*). Trabalho de conclusão de curso, 2018. Disponível em: <https://bdm.unb.br/handle/10483/24003>

SPELLERBERG, B.; BRANDT, C. *Streptococcus*. In: **Manual of Clinical Microbiology**, 11th edition. 2015.

STEPHANE, F. F. Y. JULES, B. K. J. **Terpenoids as important bioactive constituents of essential oils**. In: Essential Oils-Bioactive Compounds, New Perspectives and Applications. Publisher: IntechOpen, 2020.

SÜLSEN, V. P., LIZARRAGA, E., MAMADALIEVA, N. Z., LAGO, J. H. G. Potential of terpenoids and flavonoids from *Asteraceae* as anti-inflammatory, antitumor, and antiparasitic agents. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p.1-2, 2017.

SUN, W. et al. Molecular and biochemical analysis of chalcone synthase from Freesia hybrid in flavonoid biosynthetic pathway. **PloS one**, v. 10, n. 3, 2015a.

SUN, X. et al. Structural insights into substrate specificity of Feruloyl-CoA 6'-Hydroxylase from *Arabidopsis thaliana*. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 1-10, 2015b.

SUNDARARAJAN, B. et al. Formulation of nanoemulsion from leaves essential oil of *Ocimum basilicum* L. and its antibacterial, antioxidant and larvicidal activities (*Culex quinquefasciatus*). **Microbial Pathogenesis**, v. 125, p. 475-485, 2018.

SWALLAH, M. S. et al. Antioxidant potential overviews of secondary metabolites (polyphenols) in fruits. **International Journal of Food Science**, p. 1-8, 2020.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2013

TAKEDA, A.; WATANUKI, E.; KOYAMA, S. Effects of inhalation aromatherapy on symptoms of sleep disturbance in the elderly with dementia. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-7, 2017.

THAKUR, L. et al. Novel approaches for stability improvement in natural medicines. **Pharmacognosy Reviews**, v. 5, n. 9, p. 48-54, 2011.

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S. Essential oils: extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 7, p. R1231-R1249, 2014.

TORRES-OLIVAR, V. et al. Role of nitrogen and nutrients in crop nutrition. **Journal of Agricultural Science and Technology B**, v. 4, n. 1, p. 29-37, 2014.

TRANI, P. E. et al. Adubação orgânica de hortaliças e frutíferas. Campinas: IAC, 2013.

TSOPMO, A.; AWAH, F. M.; KUETE, V. **Lignans and stilbenes from African medicinal plants**. In: Medicinal Plant Research in Africa: Pharmacology and Chemistry, 1^a ed., Publisher: Elsevier, capítulo 12, p. 435-478, 2013.

TSUSAKA, T. et al. Genetic and environmental factors influencing the contents of essential oil compounds in *Atractylodes lancea*. **PLoS one**, v. 14, n. 5, p. e0217522, 2019.

TUREK, C.; STINTZING, F. C. Stability of essential oils: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 1, p. 40-53, 2013.

VENTURI, C. R. et al. Chemical analysis and antiviral activity evaluation of *Baccharis anomala*. **Natural Product Research**, v. 32, n. 16, p. 1960-1962, 2018.

VENUGOPALA, K. N.; RASHMI, V.; ODHAV, B. Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 01-14, 2013.

VERMA, S.K. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of bergamot-mint (*Menthacitrate* Ehrh.) essential oils isolated from the herbage and aqueous distillate using different methods. **Industrial Crops and Products**, v. 91, p. 152–160, 2016.

WARD, B. Development, synthesis and characterization of multifunctional nanomaterials. Tese de doutorado, Faculdade de Ciência, KU Leuven, Belgium, 2014.

WATANABE, M. et al. Comprehensive dissection of spatiotemporal metabolic shifts in primary, secondary, and lipid metabolism during developmental senescence in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 162, n. 3, p. 1290-1310, 2013.

WATKINS, R. et al. Natural product-based nanomedicine: recent advances and issues. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 6055, 2015.

WEBSTER, D.; TASCHEREAU, P.; BELLAND, R.J.; SAND, C.; RENNIE, R.P. Antifungal activity of medicinal plant extracts; preliminary screening studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, p. 140–146, 2008.

WHO World Health Organization. Antimicrobial Resistance, 2020. Texto informativo. Disponível em: <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/en/>

WINK, M. Plant secondary metabolites modulate insect behavior-steps toward addiction? **Frontiers in Physiology**, v. 9, n. 364, p.1-9, 2018.

WIŃSKA, K. et al. Essential oils as antimicrobial agents - myth or real alternative? **Molecules**, v. 24, n. 11, p. 2-20, 2019.

WOO, H. R. et al. Plant leaf senescence and death—regulation by multiple layers of control and implications for aging in general. **Journal of Cell Science**, v. 126, n. 21, p. 4823-4833, 2013.

WRIGHT, G. D. Something old, something new: revisiting natural products in antibiotic drug discovery. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 60, n. 3, p. 147-154, 2014.

XIONG, M. et al. Effectiveness of aromatherapy massage and inhalation on symptoms of depression in Chinese community-dwelling older adults. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 24, n. 7, p. 717-724, 2018.

XU, W. et al. Transcriptome profiling of *Vitis amurensis*, an extremely cold-tolerant Chinese wild *Vitis* species, reveals candidate genes and events that potentially connected to cold stress. **Plant Molecular Biology**, v. 86, n. 4-5, p. 527-541, 2014.

YAP, P. S. X. et al. Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. **The Open Microbiology Journal**, v. 8, p. 6-14, 2014.

YAZGAN, H. Investigation of antimicrobial properties of sage essential oil and its nanoemulsion as antimicrobial agent. **LWT Food Science and Technology**, v. 130, p. 109669, 2020.

YAZGAN, H.; OZOGUL, Y.; KULEY, E. Antimicrobial influence of nanoemulsified lemon essential oil and pure lemon essential oil on food-borne pathogens and fish spoilage bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 306, p. 108266, 2019.

ZÁLEŠÁK, F.; BON, D. J-Y. D.; POSPÍŠIL, J. Lignans and Neolignans: Plant secondary metabolites as a reservoir of biologically active substances. **Pharmacological Research**, v. 146, n. 104284, p. 1-27, 2019.

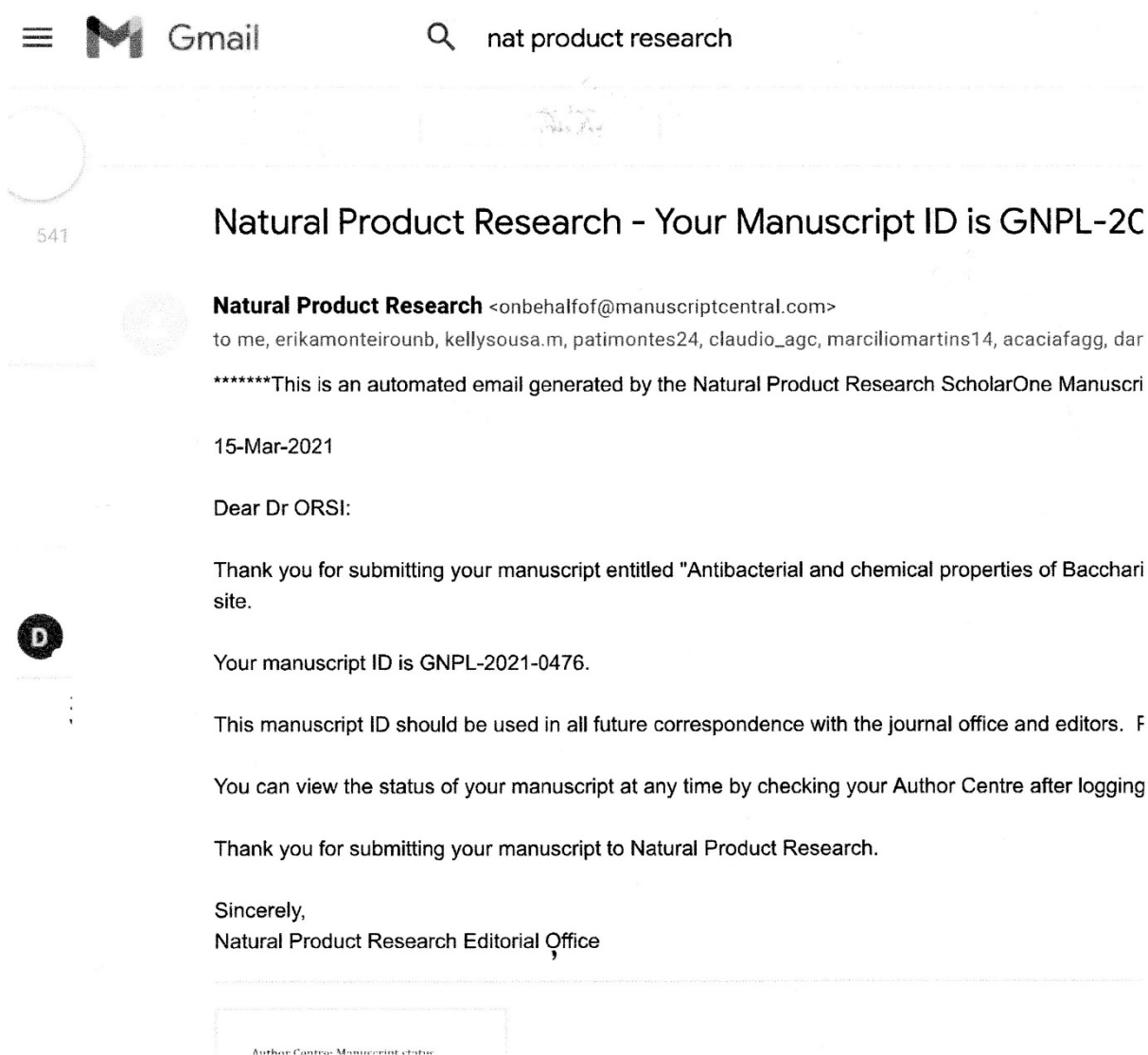
ZALEWSKI, C. A. et al. Evaluation of anti-inflammatory activity of derivatives from aerial parts of *Baccharis uncinella*. **Pharmaceutical Biology**, v. 49, n. 6, p. 602-607, 2011.

ZHANG, J. et al. Antibacterial activity and mechanism of action of black pepper essential oil on meat-borne *Escherichia coli*. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1-10, 2017.

ZHANG, Y. et al. Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Food Control**, v. 59, p. 282-289, 2016.

ZOUARI, N. Essential oils chemotypes: A less known side. **Medicinal & Aromatic Plants**, v. 2, n. 2, p. 145, 2013.

ZOUARI, N. et al. Variation of chemical composition of essential oils in wild populations of *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut., a North African endemic Species. **Lipids in Health and Disease**, v. 11, n. 1, p. 28, 2012.

ANEXO 1: Comprovante de submissão do artigo

ANEXO 2: Qualis capes da revista

Plataforma Sucupira

CORONAVIRUS (COVID-19) (HTTP://WWW.SAUDE.GOV.BR/CORONAVIRUS)

ACESSO À INFORMAÇÃO (HTTP://WWW.ACESSOAINFORM/)



ACESSO RESTRITO

(/sucupira/portais/menu_portal.jsf)

INÍCIO (/SUCUPIRA/PUBLIC/INDEX.JSF) >> Qualis >> Qualis Periódicos

Qualis Periódicos



* Evento de Classificação:

CLASSIFICAÇÕES DE PERIÓDICOS QUADRIÊNIO 2013-2016 ▾

Área de Avaliação:

 INTERDISCIPLINAR ▾ +

ISSN:

Título:

 Natural Product Research

Classificação:

 -- SELECIONE -- ▾

Periódicos

ISSN	Título	Área de Avaliação	Classificação
1478-6419	NATURAL PRODUCT RESEARCH (PRINT)	INTERDISCIPLINAR	B1

 ▾

1 a 2 de 2 registro(s)

(/sucupira/public/index.xhtml)

ANEXO 3 – Artigo submetido na revista Natural Product Research**Antibacterial and chemical properties of *Baccharis dracunculifolia* DC essential oils from different regions of Brazil**

Erika da Silva Monteiro^a, Kelly de Sousa Monteiro^b, Patrícia da Silva Montes^b, Claudio Augusto Gomes da Camara^c; Marcilio Martins de Moraes^c, Christopher William Fagg^a, Daniel Oliveira Freire^b, Lívia Cristina de Sá Barreto^b, Daniela Castilho Orsi^a

^a Laboratory of Quality Control and Post-Graduate Program in Health Sciences and Technologies, University of Brasília (UNB/FCE), Brasília, DF, Brazil.

^b Laboratory of Quality Control, University of Brasília (UNB/FCE), Brasília, DF, Brazil.

^c Department of Chemistry, Federal Rural University of Pernambuco, Street Dom Manoel de Medeiros s/n, 52.171-030 Recife, PE, Brazil

* Corresponding author: Daniela Castilho Orsi, Laboratory of Quality Control, University of Brasilia (UNB/FCE), Centro Metropolitano, Conjunto A, lote 01, Ceilândia, CEP: 72220-900, Brasília, DF, Brasil. E-mail: danielacastilhoorsi@gmail.com

Abstract

This study evaluated the antibacterial and chemical properties of the essential oils of *Baccharis dracunculifolia* from three regions of Brazil: one sample from Midwest region, another sample from Southeast region and the third sample from South region. The three essential oils showed antimicrobial activity for both Gram-positive and Gram-negative bacteria tested, with MIC values from 0.03 to 0.15 mg/mL and MBC values from 0.05 to 0.30 mg/mL. The essential oils showed in the chemical composition a predominance of sesquiterpenes bicyclogermacrene and (*E*)-nerolidol and of monoterpene limonene, however there was variation in the majority composition of these terpenes for each essential oil. The essential oil from the Midwest region of Brazil showed higher concentration of oxygenated sesquiterpenes and was more effective on

all tested bacterial strains, with lower and statistically significant CBM values and showed higher antioxidant activity in relation to oils from the Southeast and South regions of Brazil.

Keywords: *Baccharis dracunculifolia*; antimicrobial activity; antioxidant activity; essential oil composition

1. Introduction

Baccharis dracunculifolia DC (*Asteraceae*) is a native plant of South America (Machado et al., 2015; Veiga et al., 2017) and in Brazil is found in biomes of Brazilian Savanna, Atlantic Rainforest and Pampas (Cazella et al., 2019; Campos et al., 2016). The *B. dracunculifolia* leaves contain many glandular trichomes that secrete high amounts of resinous material, terpenes and essential oil and it is used by the bees to produce the Brazilian green propolis (Machado et al., 2015; Veiga et al., 2017).

B. dracunculifolia essential oil is recognized medicinally because of their various biological activities such as: antibacterial (Salazar et al., 2018; Pereira et al., 2016), antiviral (Campos et al., 2016), antifungal (Cazella et al., 2019), antiprotozoarian (Campos et al., 2016), larvicidal (Alves et al., 2018), antioxidant (Veiga et al., 2017), anti-inflammatory and immunomodulatory (Campos et al., 2016).

The *B. dracunculifolia* essential oil antimicrobial activity can be attributed to the high presence of chemical constituents (Salazar et al., 2018). The composition of *B. dracunculifolia* essential oil can vary and depends on the geographic region and the season in which the leaves were

collected, however, some studies mention the sesquiterpenes as major components (Alves et al., 2018; Barbosa et al., 2015; Cazella et al., 2019).

Although some studies have already been carried out with essential oil of *B. dracunculifolia*, there are still no studies that compare the antimicrobial activity of essential oils of this plant from different regions of Brazil. Then, the aim of the present study was to evaluate the antibacterial and chemical properties of three samples of *B. dracunculifolia* essential oils from different regions of Brazil: one sample from the Midwest region, another sample from the Southeast region and the third sample from the South region.

2. Experimental

2.1. *B. dracunculifolia* essential oils samples

The essential oil was obtained from 50 g of dried leaves by hydrodistillation for 5 h using a Clevenger-type apparatus. To produce essential oil from the Midwest region of Brazil, leaves of the *B. dracunculifolia* plant were collected at Agua Limpa Farm, Brasilia, Federal District, Brazil. The second sample of essential oil was from the city of Estiva Gerbi, São Paulo, Southeast region of Brazil. And the third sample of essential oil was from the city of Canelinha, Santa Catarina, South region of Brazil.

2.1. Bacterial strains and inoculum preparation

The following bacterial strains were used: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (Gram positive bacteria), and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1706, *Salmonella enterica* ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 25922 (Gram

negative bacteria). The bacterial inoculum was prepared using direct suspension of microbial growth in Mueller Hinton broth with turbidity equivalent to 0.5 McFarland standard ($1,0 \times 10^8$ UFC/mL), adjusted between 0.08 and 0.10 of optical density to 625 nm on a spectrophotometer.

2.2. Determination of Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and Minimal Bactericidal Concentration (MBC)

The MIC and MBC activities of *B. dracunculifolia* essential oils samples were carried out using a broth microdilution method as recommended by Clinical and Laboratories Standards Institute (CLSI, 2015), with adaptations. Briefly, the bacterial inoculum with turbidity equivalent to 0.5 McFarland standard ($1,0 \times 10^8$ UFC/mL) were diluted in Mueller Hinton broth at the ratio of 1:150, resulting in a concentration of $1,0 \times 10^6$ UFC/mL. Then, the essential oils samples were diluted in different concentrations in Mueller Hinton broth using serial dilution (the concentrations ranged from 0.30 to 0.03 mg/mL). The volume of 0.1 mL of the inoculum suspensions at $1,0 \times 10^6$ UFC/mL were distributed in to a 96-well microtiter plate containing 0.1 mL of the different concentrations of essential oils samples, resulting in a final bacterial concentration of $5,0 \times 10^5$ UFC/mL. The positive control (with bacterial growth) consisted of 0.1 mL of the bacterial inoculum and 0.1 mL of Mueller Hinton broth. The negative control (inhibition of bacterial growth) consisted of 0.1 mL of essential oils samples and 0.1 mL of Mueller Hinton broth. The plates were incubated for 24 h at 37°C. To determine MBC, 50 µL aliquots of each incubated sample were seeded on Mueller Hinton agar plates for 18–24 h, at 37°C. MBC was determined as the lowest concentration that allowed no visible bacterial growth in agar. The assays were realized in triplicate for each concentration of the essential oil samples tested. To determine MIC, bacterial growth was assessed by adding 20 µL of resazurin dye (0.01% w/v) to each well. Resazurin is an oxidation reduction indicator used to assess cell

growth. It has a non-fluorescent blue color that becomes pink and fluorescent when reduced to resorufin by oxidoreductases within viable cells (Sarker et al., 2007). The lowest concentration that showed no change in color was defined as MIC, that is, the MIC values were defined as the lowest concentration of a given essential oil of *B. dracunculifolia* that inhibited bacterial growth.

2.3. Determination of phenolic compounds and antioxidant activity

The total phenolic content was determined using the Folin Denis method (Folin & Denis, 1912), and the results were expressed as mg GAE/mL. The antioxidant activity was evaluated using DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical scavenging assay according to Kim et al. (2002) and ABTS (2,2-azinobis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) free radical scavenging assay as described by Re et al. (1999). The results were expressed as mmol Trolox equivalents per mL of sample (mM TE/mL) and as % of inhibition of DPPH radical. The tests were performed in triplicate and the results were expressed as mean \pm standard deviation.

2.4. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) analysis

FTIR spectra of the samples were carried out with a ThermoFisher Scientific Infrared Spectrophotometer. The samples were placed directly on the surface of pair of rectangular sodium chloride plate at room temperature and the measurement were performed in the IR region at 4000-600 cm^{-1} range with a resolution of 4 cm^{-1} . The spectra were analyzed using OMNIC software.

2.5. GC-FID analysis

Quantitative GC analysis were carried out using a PerkinElmer Clarus 500 GC apparatus equipped with a flame ionization detector (FID) and a non-polar DB-5 fused silica capillary column (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm) (J & W Scientific). The oven temperature was programmed from 60 to 240°C at a rate 3°C min⁻¹. Injector and detector temperatures were 260 °C. Hydrogen was used as the carrier gas at a flow rate of 1 mL min⁻¹ in split mode (1:30). The injection volume was 1.0 μL of diluted solution (1/100) of oil in n-hexane. The amount of each compound was calculated from GC-FID peak areas in the order of DB-5 column elution and expressed as a relative percentage of the total area of the chromatograms.

2.6. GC-MS analysis

Qualitative Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) analysis were carried out using a CG-EM QP2010 SE Plus Shimadzu Chromatograph system with a mass selective detector, mass spectrometer in EI 70 eV with a scan interval of 0.5 s and fragments from 40 to 550 Da. fitted with the same column and temperature program as that for the GC-FID experiments, with the following parameters: carrier gas = helium; flow rate = 1 mL min⁻¹; split mode (1:30); injected in auto injector AOC-20i a volume = 1 μL of diluted solution (1/100) of oil in n-hexane.

2.7. Identification of components

Identification of the components was based on GC-MS retention indices with reference to a homologous series of C8-C40 n-alkanes calculated using the Van der Dool and Kratz equation (Van den Dool and Kratz, 1963) and by computer matching against the mass spectral library of the GC-MS data system (NIST 14 and WILEY 14th) and co-injection with authentic standards

as well as other published mass spectra (Adams, 2017). Area percentages were obtained from the GC-FID response without the use of an internal standard or correction factors. All monoterpenes (α -pinene, β -pinene, myrcene, limonene, γ -terpinene, and terpinolene) and sesquiterpenes (β -caryophyllene, aromadendrene, α -humulene, bicyclogermacrene, (*E*)-nerolidol and spathulenol) used in the identifications of volatile components were purchased from Sigma-Aldrich - Brazil.

2.8. Statistical analysis

All data were treated with the aid of the STATISTICA[®] software. Analysis of variance (ANOVA) was performed to detect significant differences between the analyzes and when differences were statistically significant, Tukey's test for mean comparisons was used.

3. Results and discussion

3.1. Antibacterial activity of *B. dracunculifolia* essential oils samples

The MIC and MBC values of bacterial strains are shown in Table 1. Using the broth microdilution method, the three essential oils of *B. dracunculifolia* showed antimicrobial activity for both Gram-positive and Gram-negative bacteria. The oil from the Midwest region of Brazil was more effective on all tested bacterial strains, with lower and statistically significant CBM values in relation to oils from the Southeast and South regions of Brazil. Then the oil from the South region of Brazil showed lower and statistically significant values of CBM in relation to oil from the Southeast region of Brazil for bacteria *S. aureus*, *B. cereus*, *S. mutans*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae*.

The MIC results of the present study for *S. aureus* bacteria (0.05-0.10 mg/mL) were similar to those reported by Salazar et al. (2018) that found a MIC of 0.10 mg/mL for *S. aureus* using *B. dracunculifolia* essential oil from a reserve of the Atlantic Forest in the state of Paraná, in the South region of Brazil. The MBC results of this study for *S. aureus* bacteria ranged from 0.10 to 0.30 mg/mL. Veiga et al. (2017) reported MBC values of 0.30 mg/mL for *S. aureus* using *B. dracunculifolia* ethanolic extract, showing that the extract obtained from the leaves of the plant also presented antimicrobial activity. Barbosa et al. (2015) reported that *B. dracunculifolia* essential oil from the city of Botucatu, São Paulo (Southeast region of Brazil) showed activity against resistant strains of *S. aureus* MRSA (strains resistant to beta-lactam antimicrobials), with a MIC values of 6.7-8.4 mg/mL.

In the present study, the MBC values of 0.05-0.30 mg/mL for *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli* and *P. aeruginosa* were lower than that reported by Cazella et al. (2019), who observed the following MBC values: 2.10 mg/mL for *S. aureus*, 1.50 mg/mL for *B. cereus*, 8.43 mg/mL for *E. coli* and 2.10 mg/mL for *P. aeruginosa*, using *B. dracunculifolia* essential oil from the city of Cascavel, in the state of Paraná in the South region of Brazil.

The three essential oils of *B. dracunculifolia* in the present study showed MIC (0.03-0.15 mg/mL) and MBC values (0.05-0.30 mg/mL) comparable to other essential oils that have been widely studied for their recognized antimicrobial activity such as: cinnamon (*Cinnamomun zeylanicum*) essential oil (MBC values of 0.25 mg/mL for *S. aureus*, *S. enterica* and *E. coli* and 0.80 mg/mL for *P. aeruginosa*) (Barbosa et al., 2015); clove (*Syzygium aromaticum*) essential oil (MIC values of 0.02 mg/mL for *S. aureus*, *S. enterica* and *E. coli* and MBC values of 0.35 mg/mL for *S. enterica* and *E. coli* and of 0.40 mg/mL for *S. aureus*) (Farias et al., 2019); and

thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil (MIC values of 0.81 mg/mL for *K. pneumoniae* and of 0.95 mg/mL for *E. coli*) (Fournomiti et al., 2015).

3.2. Chemical properties of *Baccharis dracunculifolia* essential oils samples

Table 2 presents the results of the antioxidant activity determined by DPPH and ABTS methods and the content of phenolic compounds for the three essential oils of *B. dracunculifolia*. The oil from the Midwest region of Brazil showed higher and statistically significant values of antioxidant activity in relation to oils from the Southeast and South regions of Brazil. And the oils from the Midwest and South regions of Brazil showed higher and statistically significant values of phenolic compounds content in relation to the oil from the Southeast region of Brazil. Few studies have reported the antioxidant activity of the essential oil of *B. dracunculifolia*. Luchesi et al. (2020) found a very low antioxidant activity value of 0.012 mM TE/mL measured by the DPPH method of a *B. dracunculifolia* essential oil from state of Paraná, in the South region of Brazil. Paroul et al. (2016) analyzed the antioxidant activity using DPPH method of *B. dracunculifolia* and *B. trimera* essential oils from the city of Erechim, in the state of Rio Grande do Sul, South region of Brazil and reported similar results to our study with 53.78% of inhibition of DPPH radical by *B. dracunculifolia* essential oil and 43.51% of inhibition of DPPH radical by *B. trimera* essential oil.

Veiga et al. (2017) reported similar values of total phenolic compounds (approximately 2.00 mg/mL) in the alcoholic extract of *B. dracunculifolia* from the city of Bambuí, in the state of Minas Gerais, Southeast region of Brazil, compared to the values found for the essential oils in this study (1.24-3.06 mg/mL). According to Campos et al. (2016), *B. dracunculifolia* presents

high proportion of phenolic acids like caffeic acid, ferulic acid, p-coumaric acid, artemillin C, drupanin and 2,3-dihydrocinnamic acid.

Figure S1 shows FTIR spectra of *B. dracunculifolia* essential oils. The essential oils compounds exhibit much complexity and diversity, however, the spectra for all the samples in the range of 4000-600 cm^{-1} are similar. FTIR spectrum of the *B. dracunculifolia* essential oils indicates peaks positioned at $\sim 2900 \text{ cm}^{-1}$, $\sim 1466 \text{ cm}^{-1}$, $\sim 1380 \text{ cm}^{-1}$ and 900 cm^{-1} . Other IR signals appear in the region $\sim 1600\text{-}600 \text{ cm}^{-1}$ along with minor peak evident at $\sim 1600 \text{ cm}^{-1}$.

The bands positioned at $\sim 2900 \text{ cm}^{-1}$ correspond to the asymmetric and symmetric C–H stretches (CH_3 and CH_2) of the hydrocarbons attached to oxygen (Taraj et al., 2017) and can be attributed to the presence of nerolidol (Madhusudhanamurthy et al., 2013) and/or spathulenol (Ordoudi et al., 2020). The C=C stretches appear at $\sim 1660\text{-}1630 \text{ cm}^{-1}$, therefore the IR at $\sim 1600 \text{ cm}^{-1}$ can belong to pinene (Ciko et al., 2016) and/or limonene (Auta et al., 2018). It is known that isopropyl and gem-dimethyl groups give rise to a split umbrella mode with two peaks in the IR spectrum positioned at ~ 1385 to 1365 cm^{-1} . The splitting is caused by vibrational interaction between the umbrella modes of the two methyl groups. Additionally, the band at $\sim 1466 \text{ cm}^{-1}$ indicate the presence of a CH_3 , a CH_2 or both groups. The chemical structures of caryophyllene and germacrene consists of isopropyl or isobutyl groups, therefore the peaks at $\sim 1466 \text{ cm}^{-1}$ and at $\sim 1380 \text{ cm}^{-1}$ can belong to caryophyllene and germacrene (Taraj et al., 2019).

Table S3 shows that the most abundant compounds in all samples of essential oils were sesquiterpenes (59.88-89.29%) and monoterpenes (7.66-38.41%), representing 96.95-98.66% of essential oils composition. Twenty-five compounds were identified in the essential oil from Midwest region with the (*E*)-nerolidol (28.15%) and spathulenol (17.68%), both oxygenated

sesquiterpenes, as main compounds. Twenty-seven compounds were identified in the oil of *B. dracunculifolia* from Southeast region with monoterpene limonene (19.36%), oxygenated sesquiterpene (*E*)-nerolidol (12.75%) and sesquiterpene bicyclogermacrene (10.76%) as the main constituents. In the oil of *B. dracunculifolia* from South region twenty-eight compounds were identified with bicyclogermacrene (14.21%), (*E*)-nerolidol (13.95%) and limonene (10.49%) as the main constituents. It is interesting to note that bicyclogermacrene is the precursor of spathulenol, an oxygenated sesquiterpene that can be formed by enzymatic oxidation of bicyclogermacrene (Nascimento et al., 2018).

The results of the composition of essential oil from Midwest region was in agreement with Cazella et al. (2019), who reported that the main compounds of the essential oil of *B. dracunculifolia* from the state of Paraná, South region of Brazil were spathulenol (27.4%) and nerolidol (23.1%). Barbosa et al. (2015) also reported nerolidol (25.84%) and spathulenol (13.14%) as main components of the essential oil of *B. dracunculifolia* from the state of Minas Gerais, Southeast region of Brazil. The results from the essential oil from Southeast region were comparable to the results of Luchesi et al. (2020) that reported nerolidol (17.58%) and limonene (10.54%) as the main components of the *B. dracunculifolia* essential oil from the state of Paraná, South region of Brazil. And the results from the essential oil from South region were similar to Alves et al. (2018) that showed that the main composition of *B. dracunculifolia* essential oil from the state of Minas Gerais, Southeast region of Brazil consisted of nerolidol (30.6%) and bicyclogermacrene (9.4%).

The presence of terpenes in the *B. dracunculifolia* essential oils has been commonly associated with its antimicrobial action, since terpenes have a toxic effect on the structure and function of the cell membranes, resulting in increased fluidity and permeability and alteration of the ionic

transport process, leading to cell death (Wińska et al., 2019; Veiga et al., 2017). In this study, *B. dracunculifolia* essential oil from the Midwest region of Brazil presented higher concentration of oxygenated sesquiterpenes (*E*)-nerolidol and spathulenol and showed better antibacterial activity than *B. dracunculifolia* essential oils from the Southeast and South regions of Brazil. According to Nascimento et al. (2018) the presence of an oxygenated function in terpene enhances its antibacterial activity.

According to Chrysargyris et al. (2020), different environmental conditions resulted in significant differences in the chemical composition for most of the essential oils of the plants. These findings can be used to introduce cultivation of these plants in specific ecosystems to produce high added value products (Chrysargyris et al., 2020).

4. Conclusion

The three essential oils of *B. dracunculifolia* showed antimicrobial activity for tested Gram-positive and Gram-negative bacteria. The oil samples showed high antioxidant activity in both DPPH and ABTS assays and a high content of total phenolic compounds. The main compounds of the three essential oils in this study were the oxygenated sesquiterpene (*E*)-nerolidol, the sesquiterpene bicyclogermacrene and the monoterpene limonene, however there was variation in the majority composition of these terpenes for each essential oil. The essential oil of *B. dracunculifolia* from the Midwest region of Brazil showed higher concentration of oxygenated sesquiterpenes and better antibacterial activity than the essential oils from the Southeast and South regions of Brazil. The chemical composition of an essential oil affects its biological activities and depends on geographic region of the plant.

Acknowledgments

This study was partly financed by UNB (**Edital DPI/DPG nº 03/2020**). This study was partly financed by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), Finance Code 001 for the scholarships.

5. References

Adams RP. 2017. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy, 4 ed. Allured Publishing Corporation: Carol Stream, Illinois, 809p.

Alves KF, Caetano FH, Garcia IJP, Santos HL, Silva DB, Siqueira JM, Tanaka AS, Alves SN. 2018. *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) essential oil toxicity to *Culex quinquefasciatus* (Culicidae). Environ Sci Pollut Res. 25(31): 31718-31726.

Auta M, Musa U, Tsado DG, Faruq AA, Isah AG, Raji S, Nwanisobi C. 2018. Optimization of citrus peels D-limonene extraction using solvent-free microwave green technology. Chem Eng Commun. 205(6): 789-796.

Barbosa LN, Probst IS, Andrade BFMT, Alves FCB, Albano M, da Cunha MLRS, Doyama JT, Rall VLM, Fernandes Júnior, A. 2015. In vitro antibacterial and chemical properties of essential oils including native plants from Brazil against pathogenic and resistant bacteria. J Oleo Sci. 64(3): 289-298.

Campos FR, Bressan J, Jasinski VCG, Zuccolotto T, da Silva LE, Cerqueira LB. 2016. *Baccharis (Asteraceae)*: Chemical Constituents and Biological Activities. *Chem Biodivers*. 13: 1 – 17.

Cazella LN, Glamoclija J, Sokovic' M, Gonçalves JE, Linde GA, Colauto NB, Gazim ZC. 2019. Antimicrobial activity of essential oil of *Baccharis dracunculifolia* DC (*Asteraceae*) aerial parts at flowering period. *Front Plant Sci*. 10: 1-9.

Ciko L, Andoni A, Ylli F, Plaku E, Taraj K, Çomo A. 2016. Extraction of essential oil from Albanian *Salvia officinalis* L. and its characterization by FTIR Spectroscopy. *Asian J Chem*. 28(6): 1401-1402.

Chrysargyris A, Mikallou M, Petropoulos S, Tzortzakis N. 2020. Profiling of essential oils components and polyphenols for their antioxidant activity of medicinal and aromatic plants grown in different environmental conditions. *Agronomy* 10: 1-28.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. 2015. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*, Tenth Edition. CLSI document M07-A10, Wayne, Pennsylvania, USA.

Farias PKS, Silva JCRL, de Souza CN, da Fonseca FSA, Brandi IV, Martins ER, Azevedo AM, de Almeida AC. 2019. Antioxidant activity of essential oils from condiment plants and their effect on lactic cultures and pathogenic bacteria. *Ciênc Rural*, 49(02): e20180140.

Fournomiti M, Kimbaris A, Mantzourani I, Plessas S, Theodoridou I, Papaemmanouil V, Kapsiotis I, Panopoulou M, Stavropoulou E, Bezirtzoglou EE, Alexopoulos A. 2015. Antimicrobial activity of essential oils of cultivated oregano (*Origanum vulgare*), sage (*Salvia officinalis*), and thyme (*Thymus vulgaris*) against clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, and *Klebsiella pneumoniae*. Microb Ecol Health Dis. 26: 1-7.

Kim D-O, Lee KW, Lee HJ, Lee CY. 2002. Vitamin C equivalent antioxidant capacity of phenolics phytochemicals. J Agric Food Chem. 50: 3713-3717.

Luchesi LA, Paulus D, Busso C, Frata MT, Oliveira JB. 2020. Chemical composition, antifungal and antioxidant activity of essential oils from *Baccharis dracunculifolia* and *Pogostemon cablin* against *Fusarium graminearum*, Nat Prod Res. 1-4.

Machado RRP, Dutra RC, Pittella F, Raposo NRB, Lesche B, Duarte RS, Soares GLG, Kaplan MAC. 2015. Screening antimycobacterial activity of *Baccharis dracunculifolia*, *Centella asiatica*, *Lantana camara* and *Pterodon emarginatus*. Rev Bras Plantas Med. 17(2): 891–899.

Madhusudhanamurthya J, Rania PU, Sambasiva Raob KRS. 2013. Organic-inorganic hybrids of nano silica and certain botanical compounds for their improved bioactivity against agricultural pests. Curr Trends Biotechnol Pharm. 7 (2): 615-624.

Nascimento MNG, Junqueira JGM, Terezan AP, Severino RP, Silva TS, Martins CHG, Severino VGP. 2018. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from *Xylopiya aromatica* (*Annonaceae*) flowers and leaves. Rev Virtual Quim. 10 (5): 1578-1590.

Ordoudi SA, Papapostolou M, Kokkini S, Tsimidou MZ. 2020. Diagnostic potential of FT-IR fingerprinting in botanical origin evaluation of *Laurus nobilis* L. essential oil is supported by GC-FID-MS data. *Molecules*, 25: 1-16.

Paroul N, Lorasche RDR, Piazza SP, Bertella T, Puton BMS, Falcão L, Toniazzo GB, Cansian RL. 2016. Chemical composition and antioxidant activity of *Baccharis trimera* Pers and *Baccharis dracunculifolia* DC (*Asteraceae*). *Perspect*. 40(151): 55–64.

Pereira CA, Costa AC, Liporoni PC, Rego MA, Jorge AO. 2016. Antibacterial activity of *Baccharis dracunculifolia* in planktonic cultures and biofilms of *Streptococcus mutans*. *J Infect Public Health* 9: 324–330.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical Cation decolorization assay. *Free Rad Bio Med*. 26: 1231–1237.

Sarker SD, Nahar L, Kumarasamy Y. 2007. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurina as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods* 42: 321–324.

Salazar JJT, de Sousa JP, Lima CNF, Lemos ICS, da Silva ARP, de Freitas TS, Coutinho HDM, da Silva LE, do Amaral W, Deschamps C. 2018. Phytochemical characterization of the *Baccharis dracunculifolia* DC (*Asteraceae*) essential oil and antibacterial activity evaluation. *J Ind Crops Prod*. 122; 591–595.

Taraj K, Ciko L, Malollari I, Andoni A, Ylli F, Ylli A, Plaku E, Llupa J, Borshi XH. 2019. Eco-extraction of essential oil from Albanian *Hypericum perforatum* L. and characterization by spectroscopy techniques. *J Environ Prot Ecol*. 20(1): 188–195.

Taraj K, Malollari I, Andoni A, Ciko L, Lazo P, Ylli F, Osmeni A, Como A. 2017. Eco-extraction of Albanian chamomile essential oils by liquid CO₂ at different temperatures and characterization by FTIR spectroscopy. *J Environ Prot Ecol*. 18(1): 117–124.

Wińska K, Mączka W, Łyczko J, Grabarczyk M, Czubaszek A, Szumny A. 2019. Essential oils as antimicrobial agents - myth or real alternative? *Molecules* 24(11): 2-20.

Van Den Dool H, Kratz PD. 1963. A Generalization of the Retention Index System Including Linear Temperature Programmed Gas-Liquid Partition Chromatography. *J Chromatogr A*. 11:463-471.

Veiga RS, De Mendonça S, Mendes PB, Paulino N, Mimica MJ, Lagareiro Netto AA., Lira IS, Lopez BGC, Negrão V, Marcucci MC. 2017. Artepillin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and antioxidant activity of green propolis and *Baccharis dracunculifolia* DC. *J Appl Microbiol*. 122: 911-920.

GRAFICAL ABSTRACT

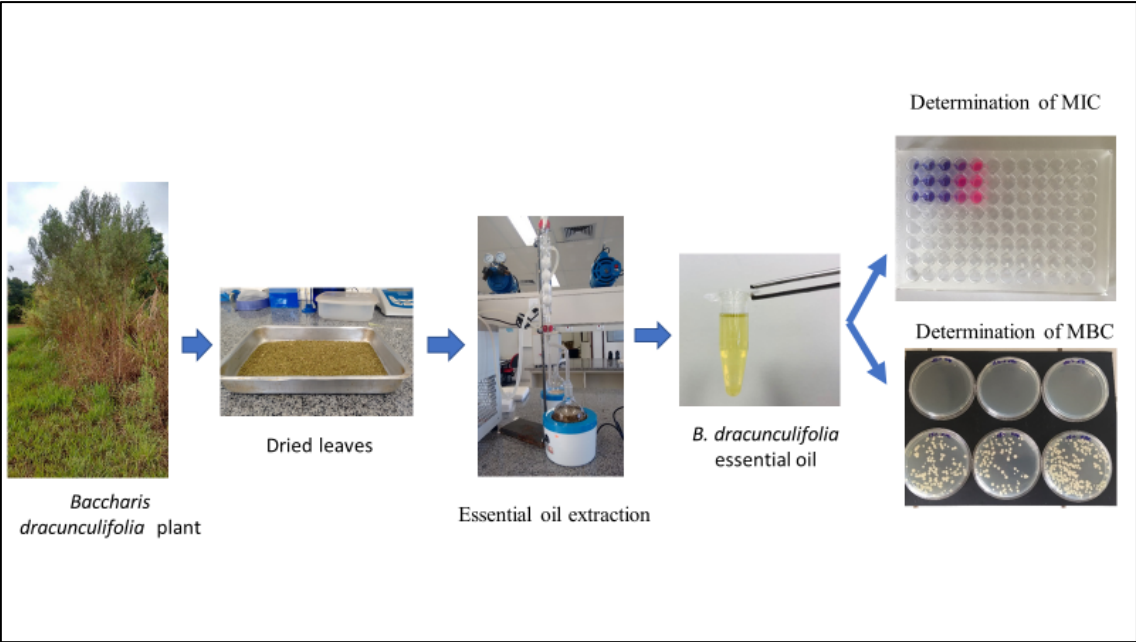


Table 1. Minimum Inhibitory (MIC) and Minimum Bactericidal (MBC) concentrations of *B. dracunculifolia* essential oils samples

Bacterial strains	<i>B. dracunculifolia</i> essential oils					
	Midwest region		Southeast region		South region	
	(mg/mL)		(mg/mL)		(mg/mL)	
	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0.10 ^a	0.05 ^b	0.20 ^c	0.10 ^a	0.30 ^d	0.10 ^a
<i>B. cereus</i> ATCC 14579	0.05 ^a	0.03 ^a	0.15 ^b	0.10 ^c	0.08 ^c	0.05 ^a
<i>S. mutans</i> ATCC 25175	0.10 ^a	0.05 ^b	0.20 ^c	0.10 ^a	0.15 ^d	0.10 ^a
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	0.10 ^a	0.05 ^b	0.20 ^c	0.15 ^d	0.20 ^c	0.10 ^a
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0.08 ^a	0.05 ^b	0.20 ^c	0.10 ^a	0.15 ^d	0.10 ^a
<i>K. pneumoniae</i> ATCC BAA-1706	0.08 ^a	0.05 ^b	0.20 ^c	0.05 ^b	0.15 ^d	0.10 ^a
<i>S. enterica</i> ATCC 14028	0.08 ^a	0.05 ^b	0.15 ^c	0.10 ^a	0.15 ^c	0.10 ^a
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0.10 ^a	0.08 ^a	0.15 ^b	0.10 ^a	0.15 ^b	0.10 ^a

Different letters within the same row mean significant differences at $p < 0.05$ according to Tukey's test at the 95% confidence level

Table 2. Antioxidant activity and content of phenolic compounds of essential oils from *B. dracunculifolia* species from three regions of Brazil

Essential oils	DPPH (mM TE/mL)	DPPH % Inhibition	ABTS (mM TE/mL)	Phenolic compounds (mg GAE/mL)
Midwest region	5.77±0.18 ^a	50.82±1.59 ^a	113.63±2.66 ^a	2.83±0.01 ^a
Southeast region	0.64±0.05 ^b	40.56±3.69 ^b	98.91±0.16 ^b	1.24±0.05 ^b
South region	2.15±0.02 ^c	49.40±0.47 ^c	102.62±2.73 ^b	3.06±0.01 ^a

The results were expressed as the mean ± standard deviation of three repetitions. Different letters within the same column mean significant differences at $p < 0.05$ according to Tukey's test at the 95% confidence level

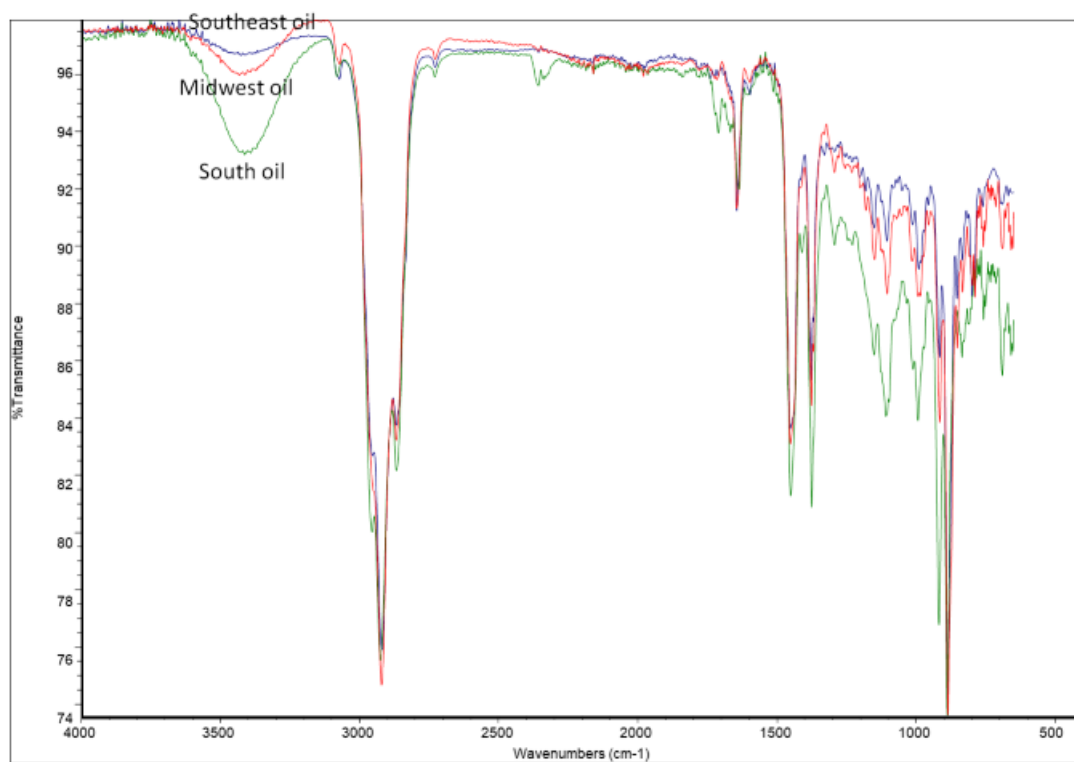
Table S3. Percentage composition of essential oils from *B. dracunculifolia* species from three regions of Brazil

	Compounds	RI ^a	RI ^b	Midwest region	Southeast region	South region	Method of identification
1	Tricyclene	920	921	-	0.35	-	RI, MS
2	α -Pinene	931	932	1.65	5.69	3.87	RI, MS, CI
3	Sabinene	966	969	-	0.39	0.35	RI, MS
4	β -Pinene	972	974	1.78	9.58	9.67	RI, MS, CI
5	Myrcene	988	990	0.22	2.26	1.18	RI, MS, CI
6	Limonene	1020	1024	4.01	19.36	10.49	RI, MS, CI
7	γ -Terpinene	1059	1059	-	0.51	0.41	RI, MS, CI
8	Terpinolene	1086	1086	-	0.27	-	RI, MS, CI
9	α -Cubebene	1347	1348	-	0.41	0.12	RI, MS
10	β -Elemene	1389	1390	-	0.49	0.72	RI, MS
11	β -caryophyllene	1414	1417	3.02	6.43	8.74	RI, MS, CI
12	Aromadendrene	1435	1439	2.12	2.96	1.44	RI, MS, CI
13	α -Humulene	1452	1452	0.74	1.51	1.47	RI, MS, CI
14	β -Santalene	1457	1457	1.75	1.50	1.52	RI, MS
15	Cabreuva oxide C	1465	1466	1.88	1.20	0.52	RI, MS
16	γ -Gurjunene	1477	1475	-	6.18	6.17	RI, MS
17	γ -Muurolene	1480	1479	1.74	0.41	0.57	RI, MS
18	Bicyclogermacrene	1499	1500	1.21	10.76	14.21	RI, MS, CI
19	α -Muurolene	1501	1500	-	1.30	-	RI, MS
20	<i>Trans</i> - β -guaiene	1503	1502	-	0.60	0.47	RI, MS

21	γ -Cadinene	1510	1513	1.47	1.41	1.10	RI, MS
22	α -Cadinene	1520	1522	4.05	5.42	3.47	RI, MS
23	γ -Cuprenene	1532	1532	1.39	-	0.37	RI, MS
24	α -Calacorene	1545	1544	0.44	-	-	RI, MS
25	(<i>E</i>)-nerolidol	1564	1561	28.15	12.75	13.95	RI, MS, CI
26	Caryolan-8-ol	1571	1570	1.73	-	0.47	RI, MS, CI
27	Spathulenol	1578	1577	17.68	4.30	9.51	RI, MS
28	β -Copaen-4- α -ol	1590	1590	8.31	1.53	2.00	RI, MS
29	1,10-di- <i>epi</i> -Cubebol	1614	1618	-	-	1.49	RI, MS
30	1- <i>epi</i> -Cubebol	1624	1627	2.24	0.33	-	RI, MS
31	Eremoligenol	1625	1629	0.33	-	2.45	RI, MS
32	γ -Eudesmol	1632	1630	2.86	-	1.14	RI, MS
33	α -Muurolol	1645	1644	3.37	-	-	RI, MS
34	Cubebol	1649	1646	0.87	-	-	RI, MS
35	7- <i>epi</i> - α -Eudesmol	1668	1666	3.94	0.39	0.91	RI, MS
	Total			96.95	98.29	98.66	
	Monoterpenes			7.66	38.41	25.97	
	Sesquiterpenes			89.29	59.88	72.69	

RI^a = Retention indices calculated from retention times in relation to those of a series C8–C40 of *n*-alkanes on a 30m DB-5 capillary column. RI^b = Retention indices from the literature. RI = Retention Indices, MS = Mass Spectroscopy and CI = Co-injection with authentic compounds.

Fig. S1. FTIR spectra of: 1) *B. dracunculifolia* essential oil from the Southeast region of Brazil; 2) *B. dracunculifolia* essential oil from the Midwest region of Brazil; 3) *B. dracunculifolia* essential oil from the South region of Brazil



ANEXO 4: Regras de submissão da revista

About the Journal

Natural Product Research is an international, peer-reviewed journal publishing high-quality, original research. Please see the journal's [Aims & Scope](#) for information about its focus and peer-review policy.

Please note that this journal only publishes manuscripts in English.

Natural Product Research accepts the following types of article:

- Research article
- Short Communication
- Review
- Letter

Open Access

You have the option to publish open access in this journal via our Open Select publishing program. Publishing open access means that your article will be free to access online immediately on publication, increasing the visibility, readership and impact of your research. Articles published Open Select with Taylor & Francis typically receive 32% more citations* and over 6 times as many downloads** compared to those that are not published Open Select.

Your research funder or your institution may require you to publish your article open access. Visit our [Author Services](#) website to find out more about open access policies and how you can comply with these.

You will be asked to pay an article publishing charge (APC) to make your article open access and this cost can often be covered by your institution or funder. Use our [APC finder](#) to view the APC for this journal.

Please visit our [Author Services website](#) or contact openaccess@tandf.co.uk if you would like more information about our Open Select Program.

*Citations received up to Jan 31st 2020 for articles published in 2015-2019 in journals listed in Web of Science®.

**Usage in 2017-2019 for articles published in 2015-2019.

Peer Review and Ethics

Taylor & Francis is committed to peer-review integrity and upholding the highest standards of review. Once your paper has been assessed for suitability by the editor, it will then be double blind peer reviewed by independent, anonymous expert referees. Find out more about [what to expect during peer review](#) and read our [guidance on publishing ethics](#).

Preparing Your Paper

Article Types

Research article

- Should be written with the following elements in the following order: Title page; Abstract; Keywords; 1. Introduction; 2. Results and Discussion; 3. Experimental; 4. Conclusions; Acknowledgments; Declaration of Interest statement; References; appendices (as appropriate); table(s) with caption(s) (on individual pages); figures; figure captions (as a list)
- Should be between 7 and 10 words, inclusive of:
 - Tables
 - References
 - Figure or table captions
- Should contain an unstructured abstract of 150 words.
- Should contain between 3 and 7 **keywords**. Read making your article more discoverable, including information on choosing a title and search engine optimization.

If including an experimental section: up to 4,500 words, including figures and tables and excluding title page, abstract and keywords. The word count should take into account the equivalent number of words for space occupied by large figures and tables. If publishing the experimental section as online-only supplemental material: up to 3,000 words including figures and tables and excluding title page, abstract and keywords. The word count should take into account the equivalent number of words for space occupied by large figures and tables.

Short Communication

- Should be written with the following elements in the following order: Title page; Abstract; Keywords; 1. Introduction; 2. Results and Discussion; 3. Experimental; 4. Conclusions; Acknowledgments; Declaration of Interest statement; References; appendices (as appropriate); table(s) with caption(s) (on individual pages); figures; figure captions (as a list)
- Should be between 3 and 4 words, inclusive of:
 - References
 - Figure or table captions
- Should contain an unstructured abstract of 150 words.
- Should contain between 3 and 7 **keywords**. Read making your article more discoverable, including information on choosing a title and search engine optimization.

Any spectra (including NMR, IR, MS), chromatograms (including TLCs, HPLC and GC traces), NMR tables and figures reporting bi-dimensional NMR correlations should either be submitted for review purposes only or as supplemental material to be published online.

Review

- Should be written with the following elements in the following order: Title page; Abstract; Keywords; 1. Introduction; 2. Results and Discussion; 3. Experimental; 4.

Conclusions; Acknowledgments; Declaration of Interest statement; References; appendices (as appropriate); table(s) with caption(s) (on individual pages); figures; figure captions (as a list)

- Should be no more than 20 pages, inclusive of:
 - Tables
 - References
 - Figure or table captions

Please send a Review proposal to the Editor-in-Chief before submission

Letter

- Should be written with the following elements in the following order: Title page; Main text; References (if required)
- Should be between 1 and 2 pages

Style Guidelines

Please refer to these [quick style guidelines](#) when preparing your paper, rather than any published articles or a sample copy.

Please use British (-ise) spelling style consistently throughout your manuscript.

Please use single quotation marks, except where ‘a quotation is “within” a quotation’.

Please note that long quotations should be indented without quotation marks.

Formatting and Templates

Papers may be submitted in Word or LaTeX formats. Figures should be saved separately from the text. To assist you in preparing your paper, we provide formatting template(s).

[Word templates](#) are available for this journal. Please save the template to your hard drive, ready for use.

A [LaTeX template](#) is available for this journal. Please save the LaTeX template to your hard drive and open it, ready for use, by clicking on the icon in Windows Explorer.

If you are not able to use the template via the links (or if you have any other template queries) please contact us [here](#).

References

Please use this [reference guide](#) when preparing your paper. An [EndNote output style](#) is also available to assist you.

Taylor & Francis Editing Services

To help you improve your manuscript and prepare it for submission, Taylor & Francis provides a range of editing services. Choose from options such as English Language Editing, which will ensure that your article is free of spelling and grammar errors, Translation, and Artwork Preparation. For more information, including pricing, [visit this website](#).

Checklist: What to Include

1. **Author details.** All authors of a manuscript should include their full name and affiliation on the cover page of the manuscript. Where available, please also include ORCiDs and social media handles (Facebook, Twitter or LinkedIn). One author will need to be identified as the corresponding author, with their email address normally displayed in the article PDF (depending on the journal) and the online article. Authors' affiliations are the affiliations where the research was conducted. If any of the named co-authors moves affiliation during the peer-review process, the new affiliation can be given as a footnote. Please note that no changes to affiliation can be made after your paper is accepted. [Read more on authorship](#).
2. **Graphical abstract** (mandatory). This is an image to give readers a clear idea of the content of your article. It should be a maximum width of 525 pixels. If your image is narrower than 525 pixels, please place it on a white background 525 pixels wide to ensure the dimensions are maintained. Save the graphical abstract as a .jpg, .png, or .tiff. Please do not embed it in the manuscript file but save it as a separate file, labelled GraphicalAbstract1.
3. You can opt to include a **video abstract** with your article. [Find out how these can help your work reach a wider audience, and what to think about when filming](#).
4. **Funding details.** Please supply all details required by your funding and grant-awarding bodies as follows:

<i>For</i>	<i>single</i>	<i>agency</i>	<i>grants</i>
This work was supported by the [Funding Agency] under Grant [number xxxx].			
<i>For</i>	<i>multiple</i>	<i>agency</i>	<i>grants</i>
This work was supported by the [Funding Agency #1] under Grant [number xxxx]; [Funding Agency #2] under Grant [number xxxx]; and [Funding Agency #3] under Grant [number xxxx].			
5. **Disclosure statement.** This is to acknowledge any financial interest or benefit that has arisen from the direct applications of your research. [Further guidance on what is a conflict of interest and how to disclose it](#).
6. **Data availability statement.** If there is a data set associated with the paper, please provide information about where the data supporting the results or analyses presented in the paper can be found. Where applicable, this should include the hyperlink, DOI or other persistent identifier associated with the data set(s). [Templates](#) are also available to support authors.
7. **Data deposition.** If you choose to share or make the data underlying the study open, please deposit your data in a [recognized data repository](#) prior to or at the time of submission. You will be asked to provide the DOI, pre-reserved DOI, or other persistent identifier for the data set.
8. **Geolocation information.** Submitting a geolocation information section, as a separate paragraph before your acknowledgements, means we can index your paper's study area

accurately in JournalMap's geographic literature database and make your article more discoverable to others. [More information](#).

9. **Supplemental online material.** Supplemental material can be a video, dataset, fileset, sound file or anything which supports (and is pertinent to) your paper. We publish supplemental material online via Figshare. Find out more about [supplemental material and how to submit it with your article](#).
10. **Figures.** Figures should be high quality (1200 dpi for line art, 600 dpi for grayscale and 300 dpi for colour, at the correct size). Figures should be supplied in one of our preferred file formats: EPS, PS, JPEG, TIFF, or Microsoft Word (DOC or DOCX) files are acceptable for figures that have been drawn in Word. For information relating to other file types, please consult our [Submission of electronic artwork](#) document.
11. **Tables.** Tables should present new information rather than duplicating what is in the text. Readers should be able to interpret the table without reference to the text. Please supply editable files.
12. **Equations.** If you are submitting your manuscript as a Word document, please ensure that equations are editable. More information about [mathematical symbols and equations](#).
13. **Units.** Please use [SI units](#) (non-italicized).

Using Third-Party Material

You must obtain the necessary permission to reuse third-party material in your article. The use of short extracts of text and some other types of material is usually permitted, on a limited basis, for the purposes of criticism and review without securing formal permission. If you wish to include any material in your paper for which you do not hold copyright, and which is not covered by this informal agreement, you will need to obtain written permission from the copyright owner prior to submission. More information on [requesting permission to reproduce work\(s\) under copyright](#).

Submitting Your Paper

This journal uses ScholarOne Manuscripts to manage the peer-review process. If you haven't submitted a paper to this journal before, you will need to create an account in ScholarOne. Please read the guidelines above and then submit your paper in [the relevant Author Centre](#), where you will find user guides and a helpdesk.

If you are submitting in LaTeX, please convert the files to PDF beforehand (you will also need to upload your LaTeX source files with the PDF).

Please note that *Natural Product Research* uses [Crossref™](#) to screen papers for unoriginal material. By submitting your paper to *Natural Product Research* you are agreeing to originality checks during the peer-review and production processes.

On acceptance, we recommend that you keep a copy of your Accepted Manuscript. Find out more about [sharing your work](#).

Data Sharing Policy

This journal applies the Taylor & Francis [Basic Data Sharing Policy](#). Authors are encouraged to share or make open the data supporting the results or analyses presented in their paper where this does not violate the protection of human subjects or other valid privacy or security concerns.

Authors are encouraged to deposit the dataset(s) in a recognized data repository that can mint a persistent digital identifier, preferably a digital object identifier (DOI) and recognizes a long-term preservation plan. If you are uncertain about where to deposit your data, please see [this information](#) regarding repositories.

Authors are further encouraged to [cite any data sets referenced](#) in the article and provide a [Data Availability Statement](#).

At the point of submission, you will be asked if there is a data set associated with the paper. If you reply yes, you will be asked to provide the DOI, pre-registered DOI, hyperlink, or other persistent identifier associated with the data set(s). If you have selected to provide a pre-registered DOI, please be prepared to share the reviewer URL associated with your data deposit, upon request by reviewers.

Where one or multiple data sets are associated with a manuscript, these are not formally peer-reviewed as a part of the journal submission process. It is the author's responsibility to ensure the soundness of data. Any errors in the data rest solely with the producers of the data set(s).

Publication Charges

There are no submission fees, publication fees or page charges for this journal.

Colour figures will be reproduced in colour in your online article free of charge. If it is necessary for the figures to be reproduced in colour in the print version, a charge will apply.

Charges for colour figures in print are £300 per figure (\$400 US Dollars; \$500 Australian Dollars; €350). For more than 4 colour figures, figures 5 and above will be charged at £50 per figure (\$75 US Dollars; \$100 Australian Dollars; €65). Depending on your location, these charges may be subject to local taxes.

Copyright Options

Copyright allows you to protect your original material, and stop others from using your work without your permission. Taylor & Francis offers a number of different license and reuse options, including Creative Commons licenses when publishing open access. [Read more on publishing agreements](#).

Complying with Funding Agencies

We will deposit all National Institutes of Health or Wellcome Trust-funded papers into PubMedCentral on behalf of authors, meeting the requirements of their respective open access policies. If this applies to you, please tell our production team when you receive your article proofs, so we can do this for you. Check funders' open access policy mandates [here](#). Find out more about [sharing your work](#).

My Authored Works

On publication, you will be able to view, download and check your article's metrics (downloads, citations and Altmetric data) via [My Authored Works](#) on Taylor & Francis Online. This is where you can access every article you have published with us, as well as your [free eprints link](#), so you can quickly and easily share your work with friends and colleagues.

We are committed to promoting and increasing the visibility of your article. Here are some tips and ideas on how you can work with us to [promote your research](#).

Article Reprints

You will be sent a link to order article reprints via your account in our production system. For enquiries about reprints, please contact the Taylor & Francis Author Services team at reprints@tandf.co.uk. You can also [order print copies of the journal issue in which your article appears](#).