

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CONSERVAÇÃO E  
MANEJO DE RECURSOS NATURAIS – NÍVEL MESTRADO

JULIETE GOMES DE LARA DE SOUZA

COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ACARICIDA E  
ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS VEGETAIS E DO ÓLEO ESSENCIAL DAS  
FOLHAS DE *ZANTHOXYLUM CARIBAEUM* L. FRENTE A SOROTIPOS DE  
SALMONELLA DE ORIGEM AVÍCOLA

CASCATEL-PR

Fevereiro/2017

JULIETE GOMES DE LARA DE SOUZA

COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ACARICIDA E  
ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS VEGETAIS E DO ÓLEO ESSENCIAL DAS  
FOLHAS DE *ZANTHOXYLUM CARIBAEUM* L. FRENTE A SOROTIPOS DE  
SALMONELLA DE ORIGEM AVÍCOLA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Conservação e Manejo de Recursos Naturais – Nível Mestrado, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais.

Orientadora: Dra. Fabiana Gisele da Silva Pinto.

CASCADEL-PR

Fevereiro/2017

FOLHA DE APROVAÇÃO.

*“Viva a tua maneira*

*Não perca a estribeira*

*Saiba do teu valor”*

*Danilo Souza e Fernando Anitelli*

## AGRADECIMENTOS

À professora Dra Fabiana Gisele da Silva Pinto, pela oportunidade e orientação. Sua compreensão e amizade foram fundamentais.

À minha família, vocês são essenciais na minha vida. AMO VOCÊS! Mãe, obrigada pelo seu amor e incentivo.

Aos meus amigos lindos: Kassiana, Ziza, Sadraque, Queite e Dani, que durante este período, não pude dar atenção que merecem.

À Adrieli Gorlin, Adriana Walerius e Rafaela Pares pela amizade, apoio, compreensão, por compartilharmos nossas tristezas, anseios, alegrias e vitórias: tornamo-nos verdadeiras amigas-irmãs;

Às meninas do laboratório de Biotecnologia agrícola: Camila Santana, Camila Vogt, Thais, Ana, Marina, principalmente a maravilhosa Andreia Bonini pelo apoio durante o mestrado.

À equipe do Herbário UNOP pelo trabalho de depósito da exsicata e identificação da planta, de muito valia para essa pesquisa, em especial à professora Livia Godinho Temponi e a sua querida aluna e amiga Jessica Patrícia.

À professora Dra DeJane por dispor de seu tempo e atenção para me auxiliar e orientar na finalização das análises

Aos professores do PPRN que contribuíram para o meu crescimento científico, em especial à professora Ana Tereza Bittencourt Guimarães;

Aos colegas de turma, por vencermos juntos essa jornada;

A todos que, de alguma forma, contribuíram para realização deste trabalho.

Muito obrigada!

## Sumário

<b>RESUMO .....</b>	<b>7</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>8</b>
<b>CAPÍTULO 1: REVISTA BRASILEIRA DE SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL – RBSPA.....</b>	<b>9</b>
Composição química e atividade antibacteriana do óleo essencial e extratos vegetais das folhas de <i>Zanthoxylum caribaeum</i> Lam. frente a sorotipos de <i>Salmonella</i> .....	9
<b>CAPÍTULO 2: JOURNAL OF ESSENTIAL OIL BEARING PLANTS.....</b>	<b>21</b>
Chemical composition, antimicrobial, repellent and antioxidant activity of <i>Zanthoxylum</i> <i>caribaeum</i> Lam. essential oil .....	21
<b>ANEXO 1 - NORMAS DA REVISTA CAP. 1.....</b>	<b>45</b>
Revista Brasileira De Saúde E Produção Animal – Rbspa .....	45
<b>ANEXO 2 - NORMAS DA REVISTA CAP. 2.....</b>	<b>49</b>
Journal Of Essential Oil Bearing Plants .....	49

## RESUMO

O gênero *Zanthoxylum* compreende espécies distribuídas mundialmente, principalmente em regiões tropicais e regiões temperadas. As plantas deste gênero têm grande importância etnobotânica, fitoquímica e a espécie *Z. caribaeum* é conhecida popularmente por espinho-de-barrão, espinho cheiroso, espinheiro-preto, mamiqueira-fedorenta, pau-de-barrão e necessita de mais estudos a respeito de seu potencial biológico. Diante disto, esta espécie foi o objeto de estudo, na qual foi investigada a composição química e as atividades biológicas antimicrobiana, antioxidante e acaricida dos diferentes extratos vegetais (aquoso, etanólico, metanólico, hexânico, acetonico, diclorometânico e de acetato de etila) e do óleo essencial. Também foi determinada a composição química do óleo essencial das folhas de *Z. caribaeum* através de cromatografia gasosa acoplada a espectrofotometria de massas (CG/EM), a atividade antimicrobiana dos extratos e do óleo essencial foi realizada pela determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) utilizando a técnica de diluição em caldo frente microrganismos patogênicos como *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Typhimurium (ATCC 14028), *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Enteritidis (ATCC 13076), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Proteus mirabilis* (ATCC 25933), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Bacillus subtilis* subespécie *spizizenii* (CCCD B005), a levedura *Candida albicans* (ATCC 10231) e frente a diferentes sorotipos de *Salmonella enterica*, de maior ocorrência e isoladas na região oeste do Paraná, Brasil. Avaliou-se também a atividade antioxidante do óleo essencial pelo método de captura de radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), bem como, a sua capacidade repelente ao ácaro *Dermanyssus gallinae* (Panzer) (Acari: Dermanyssidae) pela utilização de olfatômetro em Y. De maneira geral, a CG/EM do óleo essencial verificou-se o predomínio de terpenos, sendo os compostos majoritários o Germacreno-D,  $\alpha$ -Panasinseno,  $\beta$ -Selineno, Varidifloreno e  $\beta$ -Elemeno. Em relação a atividade antimicrobiana, com exceção do extrato aquoso, todos os extratos vegetais apresentaram atividade antimicrobiana, além disto, o óleo essencial foi efetivo frente a todas as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas testadas e alguns diferentes sorotipos de *Salmonella enterica*. Em relação a atividade antioxidante, o óleo essencial apresentou elevada capacidade antioxidante, além de ação repelente de 79% frente ao ácaro *D. gallinae*. Desta forma, conclui-se que os resultados contribuem para a caracterização química e biológica da espécie *Z. caribaeum*, sendo uma fonte promissora de metabolitos secundários com atividades biológicas.

**Palavras-chave:** CG-EM, Produtos Naturais, Concentração Inibitória Mínima, Concentração Bactericida Mínima.

## ABSTRACT

The genus *Zanthoxylum* comprises species distributed throughout tropical regions and temperate regions mainly. The plants of this genus are of great ethnobotanical, phytochemical importance. *Z. caribaeum* species are popularly known as thorn-billed thorns, thorny thorns, black hawthorn, stinky mammals, and stalks, and require further studies on its biological potential. In this study, the chemical composition, antimicrobial, antioxidant and acaricidal activities from different vegetal extracts (aqueous, ethanol, methanol, hexane, acetone, dichloromethane and ethyl acetate) and from this species essential oil were investigated. It was also determined the chemical composition of the essential oil of *Z. caribaeum* leaves through gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS), the antimicrobial activity of the extracts and of the essential oil was determined by measuring the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and Minimal Bactericidal Concentration (MBC) using broth dilution technique against pathogenic microorganisms such as *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Typhimurium (ATCC 14028), *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Enteritidis (ATCC 13076), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883), *Proteus mirabilis* (ATCC 25933), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Bacillus subtilis* subspecies *spizizenii* (CCCD B005), yeast *Candida albicans* (ATCC 10231) and against different serotypes of *Salmonella enterica*, occurring isolated in the western region of Paraná, Brazil. It was also evaluated the antioxidant activity of the essential oil by the DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl) free radical capture method, as well as its repellent capacity against *Dermanyssus gallinae* (Panzer) (Acari: Dermanyssidae), using Y-olfactometer. In general, the GC/MS of the essential oil was dominated by terpenes, the major compounds being Germacrene-D,  $\alpha$ -Panasinene,  $\beta$ -Selinene, Varidiflorene and  $\beta$ -Elemene. Regarding the antimicrobial activity, except for the aqueous extract, all the extracts showed antimicrobial activity, in addition, the essential oil was effective against all the Gram-positive and Gram-negative bacteria tested and some different serotypes of *Salmonella enterica*. In relation to the antioxidant activity, the essential oil presented high antioxidant capacity, besides a repellent action of 79% against the mite *D. gallinae*. Thus, it is concluded that the results contribute to the chemical and biological characterization of the species *Z. caribaeum*, being a promising source of secondary metabolites with biological activities.

**Keywords:** CG-MS, Natural Products, Minimal Inhibitory Concentration, Minimal Bactericidal Concentration.



2  
3 **Composição química e atividade antibacteriana do óleo essencial e extratos vegetais das**  
4 **folhas de *Zanthoxylum caribaeum* Lam. frente a sorotipos de *Salmonella***

5  
6 *Chemical composition and antibacterial activity of essential oil and leaf extracts of*  
7 *“Zanthoxylum caribaeum Lam.” against serotypes of “Salmonella”*

8  
9 SOUZA, Juliete Gomes de Lara de<sup>1</sup>; TOLEDO, Adrieli Gorlin<sup>1</sup>; SANTANA, Camila  
10 Beatriz<sup>1</sup>; SANTOS, Camila Vogt dos<sup>1</sup>; MALLMANN, Ana Paula<sup>1</sup>; SILVA, Jéssica Patrícia  
11 Borges da <sup>2</sup>; PINTO, Fabiana Gisele da Silva <sup>1\*</sup>

12  
13 <sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais, Universidade Estadual  
14 do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Laboratório de Biotecnologia Agrícola, Cascavel, Paraná, Brasil.

15 <sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais, Universidade Estadual  
16 do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Herbário UNOP, Cascavel, Paraná, Brasil.

17 \* Endereço para correspondência: fabiana.pinto@unioeste.br

18  
19 **RESUMO**

20 O presente estudo objetivou identificar e quantificar os constituintes do óleo essencial de  
21 *Zanthoxylum caribaeum* e avaliar o potencial antimicrobiano de diferentes extratos vegetais e  
22 do óleo essencial desta planta frente a diferentes sorotipos de *Salmonella enterica*, de maior  
23 ocorrência e isoladas na região oeste do Paraná, Brasil. A extração do óleo essencial foi  
24 realizada utilizando aparelho Clevenger e a composição química foi determinada por  
25 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM). Os extratos foram

26 obtidos através de diferentes solventes (etanol, metanol, hexano, acetona, diclorometano,  
27 acetato de etila e água destilada). A atividade antibacteriana foi realizada segundo a técnica de  
28 microdiluição em caldo. As análises de CG-EM resultaram na identificação de 15  
29 constituintes principais, todos terpenos, representando 63,88 % do total de óleo essencial. Os  
30 compostos majoritários identificados foram Germacreno-D (20,77%),  $\alpha$ -Panasinseno  
31 (14,40%) e  $\beta$ -Selineno (11,68%). O óleo essencial apresentou atividade antibacteriana frente a  
32 5 sorotipos de *Salmonella enterica*, com CIM e CBM variando de 7000 a 437 $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>. Já os  
33 extratos variam a CIM e CBM de 200 a 25mg.mL<sup>-1</sup>, sendo eficazes para a maioria dos  
34 sorotipos de *S. enterica*, com exceção do extrato aquoso. Os resultados sugerem que o óleo  
35 essencial e os extratos das folhas de *Z. caribaeum* representam uma alternativa para o controle  
36 de *S. enterica*, no setor avícola, refletindo uma nova perspectiva para estudos com produtos  
37 naturais.

38 **Palavras-chave:** concentração bactericida mínima, concentração inibitória mínima,  
39 cromatografia gasosa, microdiluição, produtos naturais

40

#### 41 **ABSTRACT**

42

43 The present study aimed to identify and quantify the constituents of the essential oil of  
44 *Zanthoxylum caribaeum* and to evaluate the antimicrobial potential of different plant extracts  
45 and the essential oil of this plant against different serotypes of *Salmonella enterica*, of greater  
46 occurrence and isolated in the western region of Paraná, Brazil. Extraction of the essential oil  
47 was performed using Clevenger apparatus and the chemical composition was determined by  
48 Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS). The extracts were obtained  
49 through different solvents (ethanol, methanol, hexane, acetone, dichloromethane, ethyl acetate  
50 and distilled water). The antibacterial activity was carried out according to the broth  
51 microdilution technique. The GC-MS analyzes resulted in the identification of 15

52 constituents, all terpenes, representing 63.88% of the total essential oil. The major compounds  
53 identified were Germacrene-D (20.77%),  $\alpha$ -Panasinsene (14.40%) and  $\beta$ -Selinene (11.68%).  
54 The essential oil presented antibacterial activity against 5 serotypes of *Salmonella enterica*,  
55 with MIC and CBM ranging from 7000 to 437 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Extracts range from CIM and CBM  
56 from 200 to 25 $\text{mg.mL}^{-1}$ , being effective for most serotypes of *S. enterica*, except for the  
57 aqueous extract. The results suggest that the essential oil and leaf extracts of *Z. caribaeum*  
58 represent an alternative for the control of *S. enterica* in the poultry sector, in this way a new  
59 perspective for studies with natural products.

60 **Keywords:** minimum bactericidal concentration, minimum inhibitory concentration, gas  
61 chromatography, microdilution, natural products

62

## 63 INTRODUÇÃO

64 Patógenos de origem alimentar são amplamente diversos na natureza e continuam  
65 sendo a maior causa de problemas mundiais de saúde pública, tanto em países desenvolvidos  
66 como em desenvolvimento. Dentre estes patógenos está a *Salmonella*, responsável por custos  
67 com cuidados médicos, perda de produtividade e gastos com controle pela indústria de  
68 alimentos e, principalmente, problemas para a indústria avícola (MAJOWICZ et al., 2010).

69 Os sorotipos entéricos, em geral são causadores de doenças, tais como o paratifo  
70 aviário, sendo que a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis e *S. Typhimurium*,  
71 que se sobressaem nesse subgrupo, por serem importantes causadoras de problemas  
72 relacionados a infecções alimentares no homem (OLIVEIRA et al., 2013), sobretudo, no que  
73 se refere a produtos oriundos da indústria avícola, pois os ovos e a carne são as principais vias  
74 de transmissão da doença (KOTTWITZ et al., 2008).

75 Diante disto, os produtos naturais como extratos e óleos essenciais são um excelente  
76 recurso para a busca de novas substâncias bioativas com potencial biológico, visto que,

77 possuem uma diversidade molecular superior aos produtos sintéticos (SIQUEIRA et al.,  
78 2014).

79 A planta *Zanthoxylum caribaeum* pertence à família Rutaceae com mais de 500  
80 espécies, tem distribuição mundial principalmente em regiões tropicais e subtropicais. *Z.*  
81 *caribaeum* é conhecida popularmente como espinho-preto (PIRANI & GROppo, 2015) e  
82 vem sendo muito utilizada pela população com propriedades anti-inflamatórias (VILLALBA  
83 et al., 2007). Ressalta-se que existem poucos estudos com essa espécie e nenhum relacionado  
84 com a ação biológica da mesma. Contudo, de acordo com PATINÕ & CUCA (2011)  
85 *Zanthoxylum* spp. têm ampla importância etnobotânica e biológica, logo, uma fonte  
86 promissora de substâncias com diferentes atividades biológicas.

87 Baseado neste contexto, o presente estudo objetivou a caracterização química do óleo  
88 essencial e avaliação da atividade antibacteriana do óleo e dos extratos vegetais de *Z.*  
89 *caribaeum* frente a diferentes sorotipos de *Salmonella* de origem avícola de maior incidência  
90 na região Oeste do Paraná, Brasil.

91

## 92 MATERIAL E MÉTODOS

93 Os ensaios experimentais foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Agrícola  
94 na Universidade Estadual do Oeste do Paraná. As folhas de *Z. caribaeum* foram coletadas no  
95 Parque Ecológico Paulo Gorski, localizado no município de Cascavel, região oeste do estado  
96 do Paraná (24°57'51" S / 53°26'2" O). A identificação da espécie foi realizada no Herbário da  
97 Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNOP) e a amostra registrada neste herbário, sob  
98 o número UNOP 1849.

99 Para obtenção do óleo essencial foi adicionado 60 g do material fresco de *Z.*  
100 *caribaeum* a 700 mL de água destilada e submetido a hidrodestilação por 4 horas com a  
101 utilização do equipamento tipo Clevenger (SILVA et al., 2012). O óleo obtido foi armazenado

102 sob refrigeração e ao abrigo da luz, em temperatura média de 4° C. Os constituintes do óleo  
103 essencial foram identificados através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de  
104 massa (CG-EM) e a identificação dos compostos foi realizada comparando seus tempos de  
105 retenção com os tempos de retenção obtidos na literatura (ADAMS, 2007).

106 Para preparação dos extratos as folhas de *Z. caribauem* foram secas e moídas em  
107 moinhos de facas segundo WEBER et al. (2014). Para o extrato aquoso (Aq) foi adicionado a  
108 100 mL de água destilada 40g de pó vegetal, e mantidos em agitador rotativo (shaker) a 220  
109 rpm durante 24h. Após este período, a solução foi filtrada utilizando papel filtro Whatman nº1  
110 e centrifugado a 5000 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi coletado. O mesmo foi  
111 mantido em temperatura de 4 ° C.

112 Os extratos orgânicos foram obtidos segundo metodologia de PANDINI et al. (2015)  
113 com modificações. Foram utilizados etanol (EtOH), metanol (MeOH), hexano (Hex), acetona  
114 (AcOH), diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) e acetato de etila (AcEt) como solventes. Dez gramas do  
115 material vegetal triturado foram adicionados a 100 mL do solvente orgânico desejado, a  
116 solução foi mantida em agitador rotativo a 220 rpm durante 24h. A solução foi filtrada em  
117 papel filtro Whatman nº1 e centrifugada a 5000 rotações durante 15 minutos. O sobrenadante  
118 foi coletado e o solvente evaporado em evaporador rotativo sob pressão reduzida até a  
119 obtenção do extrato bruto. Os extratos foram armazenados em freezer a 4° C.

120 Para avaliação da atividade antibacteriana foram testados 11 sorotipos de *Salmonella*  
121 *enterica* subsp. *enterica* de maior ocorrência na região Oeste do Paraná, Brasil, isolados de  
122 aviários de frango de corte da região, sendo: *S. Enteritidis*, *S. Infantis*, *S. Typhimurium*, *S.*  
123 *Mbandaka*, *S. Orion*, *S. Shwarzengrund*, *S. Cubana*, *S. Montevideo*, *S. Senftenberg*, *S.*  
124 *Grumpensis* e *S. Tennessee* cedidos pelo laboratório veterinário MercoLab, Cascavel, Paraná,  
125 Brasil.

126 Determinou-se a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial e extratos  
127 da planta de acordo com o método de microdiluição de caldo segundo metodologia de SCUR  
128 et al. (2014). Tanto o óleo essencial como os extratos vegetais foram solubilizados em  
129 metanol (100%) e caldo Mueller-Hinton (MH). Para o óleo foram testadas concentrações  
130 variando de 7000 a 1,68  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e para os extratos vegetais, concentrações de 200 a 0,09  
131  $\text{mg.mL}^{-1}$ .

132 A partir dos poços que não apresentaram crescimento bacteriano visível, antes da  
133 adição do CTT (cloreto de trifeniltetrazólio) (SCUR et al., 2014), foi retirada uma alíquota de  
134 2  $\mu\text{L}$  e inoculado na superfície de meio Ágar MH. As placas foram incubadas por 24 h a  
135  $36\pm 0,1^\circ\text{C}$  e após este período, a CBM foi definida como a menor concentração do óleo  
136 essencial capaz de causar a morte do inóculo (PANDINI et al., 2015).

137 A CIM e a CBM do óleo essencial foram classificadas de acordo com a metodologia  
138 de Sartoratto et al. (2004); entre 50-500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  são considerados de atividade elevada, sendo  
139 que, de 600 a 1.500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e acima de 1.500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , são considerados de média e baixa  
140 atividade, respectivamente. Para os extratos, a classificação seguida foi de PANDINI et al.  
141 (2015), em que a atividade foi considerada alta ( $<12,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), moderada (12,5 a 25  
142  $\text{mg.mL}^{-1}$ ), baixa (50 a 100  $\text{mg.mL}^{-1}$ ) e muito baixa ( $>100 \text{ mg.mL}^{-1}$ ).

143

## 144 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

145 O rendimento do óleo essencial obtido por hidrodestilação foi de 1,24% para *Z.*  
146 *caribaeum*. Dos constituintes químicos detectados no óleo essencial das folhas, 60,92% são  
147 sesquiterpenos e 2,96 % monoterpênicos, compondo um total de 63,88 %, sendo que os  
148 constituintes majoritários foram Germacreno D (20,77%),  $\alpha$ -Panasinseno (14,40%) e  $\beta$ -  
149 Selineno (11,68%) (Tabela 1).

150 Dos 11 sorotipos de *Salmonella* testados, 5 foram suscetíveis ao óleo essencial das  
 151 folhas de *Z. caribaeum* nas concentrações testadas (Tabela 2). O óleo apresentou inibição para  
 152 sorotipos Mbandaka, Shwarzengrund, Cubana, Senftenberg e Enteritidis, sendo que, a melhor  
 153 atividade foi reportada sobre o sorotipo Senftenberg com CIM 437,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e CBM 1750  
 154  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , deste modo, a atividade foi considerada elevada, segundo os critérios de  
 155 SARTORATTO et al. (2004).

Tabela 1. Composição química do óleo essencial das folhas de *Z. caribaeum* obtidos por hidrodestilação e analisados por *CG-EM*

Nº	Composto	TR	Área (%)	IK	IK*
1	$\beta$ -Mirceno	16,72	0,70	986,9	981 (1)
2	p-Cimeno	18,94	0,51	1020,0	1025 (1)
3	D-Limoneno	19,23	0,42	1024,2	1029 (3)
Monoterpenos hidrocarbonetos			1,63		
4	$\alpha$ -Felandreno	17,68	0,23	1002,0	993 (1)
5	Eucaliptol	19,41	1,10	1026,8	1034 (2)
Monoterpenos oxigenados			1,33		
6	Copaeno	42,68	0,46	1367,3	1370 (1)
7	$\beta$ -Bourboneno	43,16	0,39	1374,5	1374 (1)
8	$\beta$ -Elemeno	43,65	4,38	1381,9	1389 (4)
9	Cariofileno	47,58	0,56	1444,4	1410 (1)
10	Germacreno D**	49,17	20,77	1470,2	1476 (6)
11	$\beta$ -Selineno**	49,35	11,68	1473,2	1483 (1)
12	Eremofileno	49,86	6,33	1481,5	1486 (5)
13	$\alpha$ -Panasinseno**	51,40	14,40	1506,8	1518 (4)
Sesquiterpenos hidrocarbonetos			58,97		
14	Espatuleno	54,76	1,29	1564,2	1563 (1)
15	$\alpha$ -Cadinol	59,28	0,66	1643,9	1642 (1)
Sesquiterpenos oxigenados			1,95		
16	Não Identificado	50,06	20,30	1488,9	-
Total de compostos			84,18		

\*\*Compostos Majoritários; TR: Tempo de Retenção; IK: valores dos Índices de retenção calculados;

\*IK: valores dos Índices de retenção encontrados na literatura

156  
 157 NANASOMBAT & WIMUTTIGOSOL (2011), também demonstraram potencial  
 158 antimicrobiano dentro do gênero *Zanthoxylum*, sendo que o óleo essencial da espécie *Z.*  
 159 *limonella* apresentou CIM de 20  $\text{mg.mL}^{-1}$  frente ao sorotipo *S. Rissen*. De acordo com  
 160 GUTIERREZ et al., (2008) esta diversidade de combinações de constituintes químicos,  
 161 apresentadas pelos óleos essenciais, podem controlar bactérias que apresentam resistência  
 162 consistentemente elevada a agentes antimicrobianos, tal como é o caso do gênero *Salmonella*.

163 O perfil químico do óleo revelou uma proporção elevada de sesquiterpenos,  
164 principalmente de sesquiterpênicos hidrocarbonetos. Os óleos essenciais, devido à lipofilia  
165 destas substâncias de estrutura terpênic, permite a partição dos lipídeos da membrana celular,  
166 aumentando assim a permeabilidade da mesma (BAKKALI et al., 2008). Este atributo pode  
167 aumentar a ação de antimicrobianos no interior da célula, justificando assim, a atividade  
168 encontrada para os diferentes sorotipos de *Salmonella*.

Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do óleo essencial das folhas de *Z. caribaeum* frente a sorotipos de *Salmonella enterica*

Sorotipo	CIM / CBM ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )
Mbandaka	7000 / 7000
Shwarzengrund	1750 / -
Cubana	3500 / 7000
Senftenberg	437 / 1750
Enteritidis	7000 / 7000

(-) Sem atividade

169

170 Contudo, os compostos que são encontrados em menor quantidade, como neste caso, o  
171  $\alpha$ -Felandreno e D-Limoneno, podem também contribuir para atividade antimicrobiana dos  
172 óleos, sendo possível que estejam envolvidos em uma ação de sinergismo com outros  
173 compostos ativos (FRUTUOSO et al., 2013).

174 Os extratos vegetais que apresentaram melhores resultados em relação à atividade  
175 antimicrobiana das salmonelas testadas foram AcOH, AcEt e MeOH, pois todos os 11 (100%)  
176 sorotipos avaliados, apresentaram-se sensíveis aos mesmos (Tabela 3). O extrato Aq  
177 demonstrou atividade bacteriostática somente para *S. Mbandaka*, enquanto os extratos Hex e  
178  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  não apresentaram atividade inibitória, somente para o sorotipo *S. Infantis*. Já o extrato  
179 EtOH apresentou atividade antimicrobiana para 81,81% (9/11) dos sorotipos testados, com  
180 exceção das *S. Tennessee* e a *S. Enteritidis*.

181 Verificou-se que, em geral o extrato AcEt apresentou os melhores valores de CIM e  
182 CBM para os diferentes sorotipos de *Salmonella* que variaram de 25 a 50  $\text{mg.mL}^{-1}$ , quando



183 comparado com os outros extratos, sendo considerada a atividade de moderada à baixa.  
 184 Contudo, os sorotipos Grumpensis e Tennessee (25 e 50 mg.mL<sup>-1</sup>) apresentaram maior  
 185 sensibilidade ao extrato MeOH.

186 Não foram encontrados na literatura estudos referentes à atividade antimicrobiana dos  
 187 extratos vegetais de *Z. caribaeum* frente aos sorotipos de *Salmonella*. Entretanto, ZHANG et  
 188 al. (2014) relatam o potencial antimicrobiano dentro do gênero frente a bactérias Gram-  
 189 negativas. Segundo os autores, o extrato etanólico, acetato de etila, acetona e metanólico de  
 190 *Zanthoxylum bungeanum* apresentou CIM de 4,61 mg.mL<sup>-1</sup>, 2,32 mg.mL<sup>-1</sup>, 5,7 mg.mL<sup>-1</sup> e  
 191 3,1 mg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente, frente a cepa *E. coli*, corroborando com nosso estudo.

Tabela 3. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos diferentes extratos das folhas de *Z. caribaeum* frente diferentes sorotipos de *Salmonella entérica*

Sorotipo	CIM/CBM (mg.mL <sup>-1</sup> )						
	AcOH	AcEt	EtOH	Hex	MeOH	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Aq
Infantis	200/200	25/50	25/50	-	100/100	-	-
Mbandaka	100/100	25/50	50/50	100/200	25/100	200/200	200 / -
Orion	50/50	25/25	50/50	50/100	25/50	200/200	-
Shwarzengrund	100/100	25/50	50/50	100/200	25/50	100/200	-
Cubana	25/50	25/25	50/50	100/100	100/100	200/200	-
Typhimurium	25/50	25/50	100/100	100/100	25/50	100/200	-
Montevideo	50/50	25/25	50/50	100/200	50/50	200/200	-
Senftenberg	25/100	50/50	50/50	200/200	50/100	200/200	-
Grumpensis	100/200	50/50	200/200	100/200	25/50	200/200	-
Tennessee	50/50	50/50	-	100/200	25/50	200/200	-
Enteritidis	100/100	25/25	-	100/100	25/50	100/200	-

Extrato etanólico (EtOH); extrato metanólico (MeOH); extrato hexânico (Hex); extrato de acetona (AcOH); extrato de diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>); extrato de acetato de etila (AcEt); extrato aquoso (Aq); (-) Sem atividade

192  
 193 Dentre os extratos testados, o AcEt apresentou amplo espectro de ação antimicrobiana,  
 194 com atividade para diferentes sorotipos de salmonela. O AcEt é um solvente de polaridade  
 195 média, característica esta que possibilita a extração das seguintes classes químicas:  
 196 flavonóides, taninos, xantonas, ácidos triterpênicos, saponinas e compostos fenólicos em geral  
 197 (CECHINEL-FILHO & YUNES, 1998). A atividade antimicrobiana de alguns extratos

198 vegetais deve-se ao alto teor de compostos fenólicos (AL-HABIB et al., 2010; KUMAR et al.,  
199 2011).

200 Ainda, percebe-se que a utilização de solventes com polaridades diferentes na  
201 obtenção dos extratos, promoveu uma ação antimicrobiana diferenciada, sendo que tal  
202 atividade pode estar relacionada à ação de vários constituintes fitoquímicos da planta.  
203 Portanto, extratos brutos de espécies vegetais podem, muitas vezes, apresentar maior ação  
204 antimicrobiana contra patógenos, devido ao sinergismo entre os compostos bioativos que são  
205 extraídos pelo solvente ou conforme método de extração empregado (LEE & LEE, 2010;  
206 DELGADO-ADÁMEZ et al., 2012).

207 Além disto, a diferente suscetibilidade apresentada pelos sorotipos de *Salmonella*  
208 *enterica* é comumente relatada na literatura, e pode ser explicada pelos mecanismos de defesa  
209 presentes nesta bactéria Gram-negativa. Esta elevada variabilidade genética que o gênero  
210 *Salmonella* exibe, é resultante de uma interação dinâmica entre os patógenos, o meio  
211 ambiente e os diferentes hospedeiros (LIU et al., 2011; SCUR et al., 2016).

212 Por fim, conclui-se que o óleo essencial e os extratos vegetais das folhas de *Z.*  
213 *caribaeum* apresentam constituintes bioativos com atividade antimicrobiana para diferentes  
214 sorotipos de *Salmonella enterica*, sugerindo suas potencialidades futuras para o setor avícola,  
215 buscando a segurança e qualidade dos alimentos consumidos, bem como, novas perspectivas  
216 para estudos com produtos naturais na indústria.

217

## 218 REFERÊNCIAS

- 219 ADAMS R. P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/ Mass  
220 Spectrometry, Allured Publishing Corporation: Carol Stream, p. 804, 2007.  
221 AL-HABIB A., AL-SALEH E., SAFER, A.; AFZAL, M. Bactericidal effects of grape seed  
222 extracts on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **The Journal of**  
223 **Toxicological Sciences** [online], v. 35, p. 357-364, 2010.  
224 BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of  
225 essential oil: a review. **Food and Chemical Toxicology** [online], v.46, n.2, p.446-75, 2008.

- 226 CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos  
227 farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação  
228 estrutural para otimização da atividade. **Química Nova** [online], v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.
- 229 DELGADO-ADÁMEZ, J.; FERNANDEZ-LEON, M.F.; VELARDO-MICHARET, B.;  
230 GONZALEZ-GOMEZ, D. In vitro assays of the antibacterial and antioxidant activity of  
231 aqueous leaf extracts from different *Prunus salicina* Lindl. cultivars. **Food and Chemical**  
232 **Toxicology** [online], v.50, p.2481–2486, 2012.
- 233 FRUTUOSO, A. E.; NASCIMENTO, N. T. DO; LEMOS, T. L. G.; COELHO, E. L.;  
234 TEIXEIRA, D.M.A. Óleos essenciais aplicados em alimentos: Uma revisão. **Revista**  
235 **Brasileira de Pesquisa em Alimentos** [online], v.4, n.2, p.69-81, 2013.
- 236 GUTIERREZ, J.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P. The antimicrobial efficacy of plant  
237 essential oil combinations and interactions with food ingredients. **International Journal of**  
238 **Food Microbiology**, v. 124, n. 1, p. 91-97, 2008.
- 239 KOTTWITZ, L.B.M.; BACK, A.; LEÃO, J.A.; ALCOCER, I.; KARAN, M.; OLIVEIRA,  
240 T.C.R.M. Contaminação por *Salmonella* spp. em uma cadeia de produção de ovos de uma  
241 integração de postura comercial. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**  
242 [online], v.60, n.2, p.496-498, 2008.
- 243 KUMAR, K.A.; NARAYANI, M.; SUBANTHINI, A.; JAYAKUMAR, M. Antimicrobial  
244 activity and phytochemical analysis of citrus fruit peels - utilization of fruit waste.  
245 **International Journal of Engineering Science and Technology** [online], v. 3, p. 5414-5421,  
246 2011.
- 247 LEE, O.H., LEE, B.Y. Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined  
248 phenolics in *Olea europaea* leaf extract. **Bioresource Technology** [online], v.101, n.10,  
249 p.3751–3754, 2010.
- 250 LIU, W.; LIU, B.; ZHU, X.; YU, S.; SHI, X. Diversity of *Salmonella* isolates using  
251 serotyping and multilocus sequence typing. **Food Microbiology** [online], v.28, n.6, p.1182-  
252 1189, 2011.
- 253 MAJOWICZ, S.; MUSTO, J.; SCALLAN, E.; ANGULO, F.J.; KIRK, M.; O'BRIEN, S.J.;  
254 JONES, T.F.; FAZIL, A.; HOEKSTRA, R.M. The global burden of nontyphoidal *Salmonella*  
255 gastroenteritis. **Clinical Infectious Diseases** [online], v.50, n.6, p.882-889, 2010.
- 256 NANASOMBAT, S.; WIMUTTIGOSOL, P. Antimicrobial and antioxidant activity of spice  
257 essential oils. **Food Science and Biotechnology** [online], v. 20, n. 1, p. 45-53, 2011.
- 258 OLIVEIRA, A.P.; SOLA, M.C.; FEISTEL, J.C.; MOREIRA, N.M.; OLIVEIRA, J.J.  
259 *Salmonella enterica*: genes de virulência e ilhas de patogenicidade. **Enciclopédia Biosfera**,  
260 Centro Científico Conhecer [online], v. 9, n. 16, p. 1947-1972, 2013.
- 261 PANDINI, J.A.; PINTO, F.G.S.; SCUR, M.C.; ALVES, L.F.A.; CASTILHO, C.M.  
262 Antimicrobial, insecticidal, and antioxidante activity of essential oil and extracts of *Guarea*  
263 *kunthiana* A. Juss. **Journal of Medicinal Plant Research**, v.9, n.3, p.48-55, 2015.
- 264 PATINÕ, O.J.; CUCA, O.J. Monophyllidin, a new alkaloid L-proline derivative from  
265 *Zanthoxylum monophyllum*. **Phytochemistry Letters** [online], v.4, n.1, p.22-25, 2011.
- 266 PIRANI, J.R.; GROppo, M. Rutaceae. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim  
267 Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em:  
268 <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB212>>. Acesso em: 03 mar 2017.
- 269 SARTORATTO, A.; MACHADO, A.L.M.; DELARMEINA, C.; FIGUEIRA, G.M.;

- 270 DUARTE, M.C.T.; REHDER, V.L.G. Composition and antimicrobial activity of essential oils  
271 from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology** [online], v.35, n.4,  
272 p.275-280, 2004.
- 273 SCUR, M.C.; PINTO, F.G.S.; BONA, E.A.M.; WEBER, L.D.; ALVES, L.F.A.; MOURA,  
274 A.C. Occurrence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes isolates recovered from  
275 poultry of Western Paraná, Brazil. **African Journal of Agricultural Research** [online], v.9,  
276 n.9, p.823-830, 2014.
- 277 SCUR, M. C.; PINTO, F. G. S.; BONA, E.A.M.; WEBER, L.D.; FRUET, T.K.; SORESINI,  
278 G.C.G. Atividade de desinfetantes frente a sorotipos de *Salmonella* isolados de granjas  
279 avícolas. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal** [online], v.17, n.4, p. 677-684,  
280 2016.
- 281 SILVA, T. R. G. ; MARTINS, T. D. D. ; SILVA, J. H. V. ; SILVA, L. P. G. ; PASCOAL, L.  
282 A. F. ; OLIVEIRA, E. R. A.; BRITO, M. S. Inclusão de óleos essenciais como elementos  
283 fitoterápicos na dieta de suínos . **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal** [online],  
284 v.13, n.1, p. 181-191, 2012.
- 285 SIQUEIRA M.P.; CANDIDO, F.S.; AMARAL, T.M. do; MOREIRA, D.L. Atividade  
286 larvicida de extratos, frações e substâncias isoladas de espécies de Piperaceae do Estado do  
287 Rio de Janeiro. **Boletim Informativo Geum** [online], v.5, n.2, p.35-43, 2014.
- 288 VILLALBA, M. A.; CARMO, M. I.; LEITE, M. N.; SOUSA, O. V. Atividades  
289 farmacológicas dos extratos de *Zanthoxylum chiloperone* (Rutaceae). *Revista Brasileira de*  
290 *Farmacognosia*. [online]. v.17, n.2, p.236-241, 2007.
- 291 WEBER, L.D.; PINTO, F.G.S.; SCUR, M.C.; SOUZA, J.G.L.; COSTA, W.F.; LEITE C.W.  
292 Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activity of essential oil and various  
293 plant extracts from *Prunus myrtifolia* (L.) Urb. **African Journal of Agricultural Research**  
294 [online], v.9, n.9, p.846-853, 2014.
- 295 ZHANG, Y., LUO, Z., WANG, D., HE, F., LI, D. Phytochemical profiles and antioxidant and  
296 antimicrobial activities of the leaves of *Zanthoxylum bungeanum*. **The Scientific World**  
297 **Journal** [online], v. 2014, n. 2014, p. 1-13, 2014.
- 298

1 **Capítulo 2: Journal of Essential oil Bearing Plants**

2  
3 **Chemical composition, antimicrobial, repellent and antioxidant**  
4 **activity of *Zanthoxylum caribaeum* Lam. essential oil**  
5

6 Juliete Gomes de Lara de Souza<sup>1</sup>, Adrieli Gorlin Toledo<sup>1</sup>, Adriana Helena Walerius<sup>1</sup>, Wagner  
7 Alex Jann Favreto<sup>2</sup>, Willian Ferreira da Costa<sup>2</sup>, Fabiana Gisele da Silva Pinto<sup>1\*</sup>  
8

9 <sup>1</sup> Laboratório de Biotecnologia, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, PR, BR.

10 <sup>2</sup> Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, BR.

11 \*Corresponding author (Fabiana Gisele da Silva Pinto)

12 E-mail: <fabiana.pinto@unioeste.br>  
13

14 **Resume:** The extracted compounds from essential oil of the species *Zanthoxylum caribaeum*  
15 were analyzed by GC-MS and tested to measure the antimicrobial potential of this oil by  
16 microdilution method in broth against standard microorganisms, determine the oil antioxidant  
17 activity by the free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) capture method, and  
18 evaluate *Dermanyssus gallinae* (Panzer) (Acari: Dermanyssidae) mite repellent, tested in a Y-  
19 tube olfactometer. The GC-MS analysis resulted in the identification of 20 constituents, all  
20 terpenes representing 75.46% of the essential oil total area. The main compounds identified  
21 were  $\alpha$ -panasinsene (12.75%), varidiflorene (11.23 %),  $\beta$ -elemene (10.61 %) and  $\beta$ -selinene  
22 (8.72 %), all others were sesquiterpenes and a diterpene. Regarding to the antimicrobial  
23 activity, the essential oil was effective against all Gram-positive bacteria tested and Gram-  
24 negative strains of *Salmonella enterica*. The antioxidant activity values showed that there was

---

<sup>1</sup> Rua Universitária, 2069 – Jardim Universitário, 85819-110, Cascavel, Paraná, Brazil.

<sup>2</sup> Avenida Colombo, 5790 - Jardim Universitário, 87020-900, Maringá, Paraná, Brazil.

25 no considerable difference between butylated hydroxytoluene (BHT) and essential oil,  
26 revealing its high antioxidant capacity of 90.22%. In addition, the oil presented a repellent  
27 action of 79% to the *D. gallinae* mite in the olfactometer tests. Finally, the study contributed  
28 to the chemical and biological characterization of the essential oil of *Z. caribaeum*, reporting  
29 for the first time repellent activity against *D. gallinae*.

30

31 **Keywords:** espinheiro-cheiroso, GC-MS, microdilution, *Dermanissus gallinae*, olfactometer

32

### 33 **Introduction**

34 The genus *Zanthoxylum* belongs to the Rutaceae family and is represented by more than  
35 28 species that are widely distributed in tropical regions. They are recognized for their  
36 essential oils often containing limonene, germacrene D,  $\alpha$ -pinene, and  $\beta$ -caryophyllene  
37 (Vieira et al., 2009). These compounds already reported biological activities as insecticide,  
38 cytotoxic and antibacterial (Wang et al., 2011; Boehme et al., 2008).

39 Among the vegetal originated natural products we can highlight the essential oils,  
40 secondary metabolites obtained from plants, characterized as a complex mixture of volatile  
41 compounds, wich present a hydrophobic character, some distinguished by exhaling aromas  
42 (Oliveira et al., 2011). Researches point out that essential oils represent an alternative and  
43 interesting approach against the occurrence of drug-resistant microbial pathogens. (Solórzano-  
44 Santos and Miranda-Navales, 2012). Recently recognized as powerful natural antioxidants,  
45 the oils could be used as potential substitutes for synthetic antioxidants in the food and  
46 pharmaceutical industry (Mimica-Dukic et al., 2003; Bozin et al., 2006).

47 Furthermore, studies have been directed at the bioactivity of essential oils such as  
48 insecticides and repellents, as they are less harmful to the environment and reduce the  
49 emergence of resistance among pest-arthropods (Rajendran and Sriranjini, 2008; Faroni et al.,

50 1995). One of them, the mite *Dermanyssus gallinae* birds ectoparasite, with cosmopolitan  
51 occurrence, is recognized as being a possible vector of a variety of pathogens (Durden et al.,  
52 1993). Therefore, the need of alternative control forms of this mite with products of natural  
53 origin is evidenced, since the widespread use of chemical control stimulates the recurrence of  
54 resistant pests and generates durable and toxic residues in the environment as it is a synthetic  
55 product.

56 Studies on the chemical composition of essential oil of species of the genus  
57 *Zanthoxylum* have been frequently reported in literature. The most abundant compounds  
58 classes found in leaf oils are terpenoids, as well as alcohols, aldehydes and simple ketones.  
59 Terpenoids constitute most of the oils mass from *Z. monophyllum*, *Z. acuminatum* and *Z.*  
60 *fagara* leaves (Setzer et al., 2005).

61 However, the constitution of the essential oil of the species *Z. caribaeum* and its  
62 biological activities is little reported. Thus, the objectives of the study were to identify the  
63 metabolites present in the essential oil of the leaves of *Z. caribaeum*, evaluate the  
64 antimicrobial, antioxidant and repellent activity against the mite *Dermanyssus gallinae* (Acari:  
65 Dermanyssidae).

66

## 67 **Material and Methods**

### 68 **Plants collection and identification**

69 Leaves of *Z. caribaeum* were collected during 2015 January to April, in the ecological  
70 park Paulo Gorski, situated in Cascavel city, West region of the state of Paraná (24°57'51" S /  
71 53°26'2" O). An exsiccate of the plant was incorporated in the Universidade Estadual do  
72 Oeste do Paraná herbarium (UNOP) for the botanical identification and registration of the  
73 voucher, with the number UNOP 1849.

74

75

## 76 **Essential oil obtainment**

77 For the essential oil extraction, 60 g of fresh *Z. caribauem* plant material was added in  
78 water (1:12 w: v). Thereafter, the material was subjected to hydrodistillation using Clevenger  
79 apparatus for 3-4 h. Subsequently, after obtaining the oil, it was stored at 4 ° C in the dark.

80

## 81 **Identification of the essential oil compounds**

82 The analyses of the essential oil compounds were performed using a FOCUS GS gas  
83 chromatograph (Thermo Electron) coupled to a DSQ II mass spectrometer (Thermo Electron)  
84 and a detector with electron ionization impact at 70 eV and quadrupole-type mass analyzer.  
85 Chromatographic separation was carried out using a DB-5 fused-silica capillary column (30 m  
86 x 0.25 mm inner diameter, film thickness 0.25 µm) and 5% phenyl/95% dimethylpolysiloxane  
87 stationary phase.

88 The injector temperature was 250 °C and the carrier gas flow was kept constant at 1  
89 mL.min<sup>-1</sup>. The sample and the alkane standards C7-C28 were injected at a split-ratio of 1:25.  
90 The temperature program was: initial temperature of 50 °C/2 min; followed by an increase to  
91 180 °C/2 °C min<sup>-1</sup>, and 290 °C/5 °C min<sup>-1</sup>. The interface between the GC and the MS was  
92 kept at 270 °C, and the temperature of the ionization source for the mass spectrometric  
93 analysis was 250 °C. The identification of the compounds was accomplished by comparing  
94 their retention times with the retention times obtained from the literature and through their  
95 Retention Indices (Adams, 2007).

96

## 97 **Microorganisms used and inoculum preparation.**

98 Collection strains from American Type Culture Colletion (ATCC) and from coleção  
99 de culturas Cefar Diagnóstica (CCCD), were used to evaluate the antimicrobial potential, with



100 six Gram-negative strains: *Salmonella enterica* subspecies enterica serovar Typhimurium  
101 (ATCC 14028), *Salmonella enterica* subspecies enterica serovar Enteritidis (ATCC 13076),  
102 *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Proteus mirabilis*  
103 (ATCC 25933), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) and four Gram-positive strains:  
104 *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228),  
105 *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Bacillus subtilis* subspecies *spizizenii* (CCCD B005)  
106 and the yeast *Candida albicans* (ATCC 10231).

107

### 108 **Minimal Inhibitory Concentration (MIC)**

109 The MIC of the essential oil was determined according to the microdilution method  
110 with modifications (Pandini et al., 2015). The essential oil was solubilized in methyl alcohol  
111 and Mueller-Hinton (MH) broth in the case of bacteria and in RPMI-1640 broth for *C.*  
112 *albicans*. After serial dilutions of 7,000 to 1,68 µg / mL, 10 µL of each inoculum was added to  
113 each well and the plates were incubated for 18 to 24 hours at  $36 \pm 0.1$  ° C. Subsequently, 10  
114 µL of 0.5% triphenyltetrazolium chloride (TTC) was added, and the plates were again  
115 incubated for 3 hours at  $36 \pm 0.1$  ° C. The presence of red staining was interpreted as negative  
116 evidence of the inhibitory effect of essential oil.

### 117 **Minimum Bactericidal Concentration (MBC) and Minimum Fungicidal Concentration** 118 **(MFC)**

119 According to the proposed method with modifications (Weber et al., 2014). Prior to  
120 the addition of TTC to all wells, an aliquot of 2 µL was inoculated onto the surface of MH  
121 agar. The plates were incubated for 24 hours at  $36 \pm 0.1$  ° C and after this period the MBC  
122 was defined as the lowest concentration of essential oil capable of causing the inoculum  
123 death. As a positive control for the bacteria, Gentamicin (200 mg / mL) was used and for *C.*  
124 *albicans*, Nystatin (200 mg / mL) were used.

125 The MFC and MBC of the essential oil were classified in relation to the antimicrobial  
126 activity: between 50-500 µg/mL considered high, of 600 to 1500 µg/mL and above considered  
127 1500 µg/mL considered medium and low, respectively (Sartoratto et al., 2004).

128

### 129 **Evaluation of antioxidant activity (DPPH)**

130 The antioxidant activity of the essential oil was carried out according to the free  
131 radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) reduction method , based on the methodology  
132 presented with modifications (Pandini et al., 2015). For this, aliquots of 0.1 mL of the pure oil  
133 were added to 3.9 mL of DPPH methanolic solution (0.2 mM) and slightly homogenized on a  
134 tube shaker. The absorbance of the samples was read at 515 nm. An aliquot of 0.1 ml of the  
135 control solution (methyl alcohol, acetone and water) was used for the negative control, and for  
136 the positive control, maintained under the same conditions as the negative control, the  
137 synthetic antioxidant Butylhydroxytoluene (BHT) was used. The tests were performed in  
138 triplicate. Methyl alcohol was used as a blank for spectrophotometer calibration. The ability  
139 to eliminate DPPH (% of antioxidant activity) was calculated using the following equation:  
140  $I\%: [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$ , where  $A_0$  is the absorbance of the control and  $A_1$  is the  
141 absorbance of sample. The IC 50 (amount of antioxidant substance needed to reduce the  
142 initial concentration of DPPH by 50%) was calculated based on the equation of the straight  
143 line obtained from the calibration curve. The obtained data were analyzed by the Chi-square  
144 test of adhesion using the statistical program R® 3.3.2. version.

145

### 146 **Repellent test**

147 The repellency of *Z. caribaeum* essential oil was evaluated to the chicken red mite *D.*  
148 *gallinae*, using the Y-tube glass olfactometer (22 cm × 14 cm × 2 cm), containing a main tube  
149 and two tubes (arms) that form an angle of 120 ° with the main tube. During the tests, the

150 olfactometer was operated with a continuous air flow of 4L/min, previously filtered in  
151 activated charcoal and humidified. The experiments were carried out in an air conditioned  
152 room ( $25 \pm 2$  ° C, 70% U.R.), with an inverted photoperiod, since *D. gallinae* showed  
153 nocturnal habit, remaining crowded and hidden during the day. To observe the repellency  
154 behavior, a red light bulb was used, since it does not influence the vision of arthropods.

155 A total of 30 replicates were performed, and for each replicate, five ingurgitated adult  
156 females of *D. gallinae* were previously selected and acclimatized. As odor source a piece of  
157 filter paper (2 cm x 1 cm) impregnated with 10  $\mu$ L of pure *Z. caribauem* essential oil was used  
158 , and a piece of cleaned filter paper (2 cm x 1 cm) as a control. Each piece of filter paper was  
159 placed at the base of each olfactometer arm. The mites were released at the base of the main  
160 tube and their behavior was observed for 5 minutes. The time the mite took to reach the fork  
161 of the olfactometer and to walk 4 cm in the arm of the olfactometer containing or not the  
162 treatment with the oil, was recorded. After five repetitions, the olfactometer was inverted  
163 (180°) in order to cancel possible points of external interference. For each ten replicates, the  
164 olfactometer was washed with distilled water and ethyl alcohol and then dried in an oven.

165 The results, regarding the choice of odor source were analyzed statistically by the chi-  
166 square test and the response time was analyzed by the t-test, with a significance level of 0.05.  
167 For statistical analysis, the software R® version 3.3.2 was used.

168 The repellent action was also expressed based on the Preference Index (PI), according to  
169 the calculation:  $PI = (\% PIT - \% Pit) / (\% PIT + \% Pit)$ , where PI is Preference Index, % PIT is  
170 Percentage of mites on the repellent side, % Pit is the percentage of mites in the control. From  
171 -1.00 to -0.10 the oil has action considered repellent; From -0.10 to + 0.10, neutral action and  
172 from +0.10 to +1.00, the oil has attractive action against the mite (Procópio et al., 2003).

173

174

175 **Results and discussion**

176 **Characterization and chemical profile**

177 The yield of essential oil obtained by hydrodistillation was 0.55% (w/w) for *Z.*  
178 *caribaeum*. The analysis of the volatile compounds of the essential oil allowed the  
179 identification and quantification of 20 constituents (Table 1). The main ones were  
180 sesquiterpenes:  $\alpha$ -Panasinsene (12,75%), Viridiflorene (11,23 %),  $\beta$ -Elemene (10,61 %) and  
181  $\beta$ -Selinene (8,72 %).

**Table 1. Chemical composition of the essential oil of *Z. caribau* leaves obtained by hydrodistillation and analyzed by GC-MS.**

Nº	Compound	TR	Area (%)	IK	IK*
1	$\delta$ -Elemene	24,63	0,04	1345	1347
2	$\alpha$ -Cubebene	25,14	0,01	1356	1355
3	$\alpha$ -Copaene	26,35	0,05	1384	1383
4	$\beta$ -Elemene**	26,98	10,61	1398	1392
5	$\beta$ - Caryophyllene	28,16	1,09	1426	1428
6	$\alpha$ -Guaiene	28,86	2,37	1443	1443
7	Germacrene D	30,71	2,20	1487	1487
8	$\beta$ -Selinene**	30,83	8,72	1490	1490
9	$\beta$ - Eudesmane	31,04	6,25	1495	1496
10	Valencene	31,18	5,15	1499	1499
11	Viridiflorene**	31,34	11,23	1503	1499
12	$\delta$ - Guaiene	31,58	0,73	1509	1508
13	Eremofilene	31,77	3,91	1513	1505
14	$\alpha$ -Panasinsene**	32,24	12,75	1525	1530

15	$\alpha$ - Caryophyllene	29,65	1,07	1462	1467
<b>Sesquiterpenes hydrocarbons</b>			<b>66,18</b>		
16	Espatulenol	34,53	0,10	1583	1582
17	Selina-6-en-4-ol	36,31	2,38	1629	1615
18	$\tau$ -Gurjunenepoxide-(2)	37,10	2,93	1650	-
19	Eudesm-11-en-1-ol	37,77	3,87	1667	1651
<b>Sesquiterpenes oxygenated</b>			<b>9,28</b>		
20	Fitol	52,84	0,08	2113	2115
<b>Diterpenes</b>			<b>0,08</b>		
21	Non identified	37,60	7,87	1663	-
<b>Total</b>			<b>83,33</b>		

\*\* Major compounds; RT: Retention Time; IK: values of calculated retention indices; \* IK: values of retention indices found in the literature.

182

183 The oil composition *Z. caribaeum* leaves is in agreement with the data described in  
184 the literature for essential oils of the genus *Zanthoxylum*. In the species *Z. riedelianuin* nine  
185 compounds were found in the essential oil, representing about 80% of the same, being  
186 espatulenol (65.2%) the main compound, whereas other sesquiterpenes such as  
187 aromadendrene (4.7%), caryophyllene oxide (3,7%), cisnerolidol (1,9%),  $\beta$ -elemene (0,6%)  
188 and 6-cadinene (0,6%) were also reported (Guy and Guinaudeau, 2001).

189 In a study with *Z. caribaeum* essential oil silvestrene was found, corresponding to  
190 11.3% of the oil, Muurola-4 (14) 5-trans-diene (8.4%), isodaucene, 3%) and  $\alpha$ -pinene (7.6%)  
191 (Nogueira et al., 2014). However, the oil composition described for *Z. caribaeum* in the  
192 present study was qualitatively and quantitatively different, suggesting a considerable  
193 variability due to external causes such as plant life cycle, harvesting methods, extraction  
194 methodology and environmental conditions (temperature, wind, time of exposure to solar

195 radiation, air humidity, season), which affects the presence and abundance of secondary  
196 metabolites (Spitaler et al., 2006).

197

### 198 **Antimicrobial activity**

199 The results presented (table 2) indicate that the essential oil of this species presented  
200 antimicrobial activity for six strains tested, four Gram positive; *S. aureus* with MIC of 109  
201 µg/mL and CBM of 218 µg/mL, *S. epidermidis* with MIC of 54 µg/mL and MBC of 109  
202 µg/mL, *E. faecalis* with MIC and MBC of 437 µg/mL and *B. subtilis* and two Gram  
203 negative, both serotypes of *S. entérica* with MIC and MBC 7000 µg/mL.

204 The activity found against the *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis*, *B. subtilis*, *S.*  
205 *enteritidis* and *S. typhimurium* strains is possibly related to the large amount of sesquiterpene  
206 present in this essential oil, because they are hydrophobic, The terpenoids promote the  
207 breakdown of lipids from the bacterial cell membrane, disintegrating the structures and  
208 making them more permeable, as well as causing protein disturbance, inhibition of respiration  
209 and alteration of the ion transport process (Sikkema et al., 1994 ; Trombetta et al., 2005). In  
210 addition to acting on the plasma membrane, terpenoids intervene in the cell's mitochondrial  
211 activity (Bakkali et al., 2008). The highest sensitivity of Gram-positive strains to Gram-  
212 negative strains in species that constitute the genus *Zanthoxylum* was reported in a research  
213 with the species *Z. elephantiasis* and in another work with extracts of *Z. tingoassuiba* (Islam  
214 and Ahsan, 1997; Silva et al., 2008).

**Table 2. Minimal Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Bactericidal Concentration (MBC) and Minimum Fungicide Concentration (MFC) of *Z. caribaeum* essential oil against pathogenic microorganisms.**

Microorganisms	MIC (µg/mL)	MBC/MFC (µg/mL)
----------------	----------------	--------------------

<b>Gram-negative</b>		
<i>S. Typhimurium</i> (ATCC 14028)	7000	7000
<i>S. Enteritidis</i> (ATCC 13076)	7000	7000
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	-	-
<i>K. pneumoniae</i> (ATCC 13883)	-	-
<i>P. mirabilis</i> (ATCC 25933),	-	-
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	-	-
<b>Gram-positive</b>		
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	109	218
<i>S. epidermidis</i> (ATCC 12228)	54	109
<i>E. faecalis</i> (ATCC 19433)	437	437
<i>B. subtilis</i> (CCCD B005)	109	109
<b>Yeast</b>		
<i>C. albicans</i> (ATCC 10231)	-	-

(-) No activity

215

216 This difference can be due to the distinct composition of the bacterial wall, since the  
 217 Gram negative ones present multiple structures with complex layers, which can thus hamper  
 218 the penetration of the essential oil tested. The double membrane presented by the Gram  
 219 negative bacteria forms a distinct envelope, protecting them against the action of  
 220 antimicrobial agents, unlike Gram positive (Holley and Patel, 2005).

221 Gram negative bacteria such as *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* and *P.*  
 222 *aeruginosa*, were resistant to the concentrations of the essential oil of *Z. caribaeum*, unlike  
 223 the Gram positive strains. These results corroborate with those in the literature, which report a  
 224 greater susceptibility of Gram-positive bacteria to vegetal compounds (Burt, 2004).

225           However, two *S. enterica* serotypes showed susceptibility at the highest concentration  
226 tested. This antimicrobial activity may be related to the presence of different constituents such  
227 as germacrene D, a compound present in many essential oils with proven antimicrobial  
228 activity and insecticidal activity for different plant species (Juteau et al., 2002; Gonzaga et al.,  
229 2003). In the present study, The spatulenol component present in the oil of *Z. caribaeum*  
230 presents important biological activity with antibacterial properties and moderate cytotoxic  
231 activity (Limberger et al., 2004). Nevertheless, the synergistic effect of the components  
232 present in the oil should not be disregarded, since this effect can broaden the spectrum of  
233 antimicrobial action (Santos et al., 2012).

234           The results observed in this assay indicate high essential oil antibacterial activity  
235 against all Gram positive strains tested with MIC and MBC values ranging from 54 to 109  
236 µg/mL. However, in relation to the two Salmonella serotypes showed low activity.

237           Despite the reported inhibitory/ bactericidal activity no fungicidal activity was  
238 detected with the *Z. caribaeum* oil in the present study. The variety of constituents of the oil  
239 in a greater or lesser amount, as well as the invasive power of the strains used may influence  
240 the antimicrobial activity against fungi (Souza et al., 2005).

241

#### 242 **Antioxidant activity**

243           The analysis of *Z. caribaeum* essential oil antioxidant activity results shows that there  
244 are no statistically significant differences between the percentage of free radical DPPH  
245 sequestration, being 94.95% for BHT and 90.22% for essential oil. Therefore, the essential oil  
246 presented antioxidant activity very close to the commercial synthetic antioxidant BHT (Test  
247  $\chi^2 = 0.12082$ ; GL = 1; p = 0.7281). Regarding the IC 50, the difference between the values of  
248 the synthetic antioxidant (BHT) and the essential oil is small, with no statistically significant



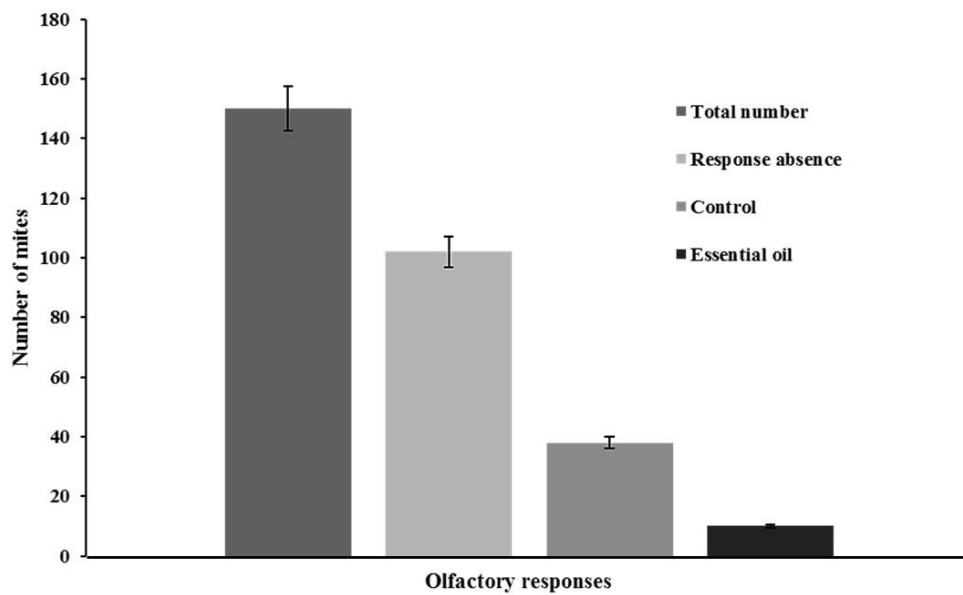
249 difference. (1.50 for BHT and 2.77  $\mu\text{g} / \text{mL}$  for essential oil), (Test  $\chi^2 = 0.37773$ , GL = 1, p =  
250 0.5388).

251 The ability to sequester free radicals from *Z. caribauan* essential oil can be attributed  
252 to the prevalence of terpenoids, especially mono and sesquiterpenoids, which often have  
253 functions in plants, such as protection against herbivores, production of antimicrobial agents  
254 and attractive to natural pollinators (Sikkema et al., 1994). Other functions that have not yet  
255 been elucidated for most isoprenic derivatives are thermo-protection effects, photo-respiration  
256 at high temperatures and low oxygen concentrations, allelopathy and photoprotection, as well  
257 as protection against oxidative damage, thus justifying the antioxidant potential found in this  
258 work (Owen and Peñuelas, 2005).

259 In addition, a study within the genus *Zanthoxylum* confirmed its excellent antioxidant  
260 potential, very close to the values found for commercial antioxidants, such as the *Z. armatum*  
261 species, which presented an IC<sub>50</sub> value of  $27.0 \pm 0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$  in relation to the acid (Positive  
262 control) with IC 50 of  $15.0 \pm 0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ , justifying its antioxidant capacity by the presence of  
263 major compounds such as bornyl, cimene,  $\alpha$ -copaene,  $\gamma$ -terpinene, camphene,  $\beta$ -ocimene and  
264 linalol Et al., 2012). Other species, *Z. leprieurii* and *Z. xanthoxyloides* also exhibited  
265 antioxidant activity with significant IC<sub>50</sub> values relative to the positive control (Dongmo et al.,  
266 2008).

### 267 **Repellent activity**

268 The bioassays performed on olfactometer were composed of 150 female mites, 38 of  
269 which responded to the olfactory stimulus, choosing the arm with the control, while 10 chose  
270 the arm containing *Z. caribauen* essential oil and 102 did not present any response (Figure 1).  
271 Mites that did not choose any olfactometer arms showed the same behavior, walking around  
272 the main tube, especially at the entrance, some of them reaching the middle of the main tube  
273 and returning to the entrance.



275

276 **Figure 1.** Olfactory responses of *D. gallinae* females to the essential oil

277

of *Z. caribauen* and control, in olfactometer in Y.

278

279

280

281

282

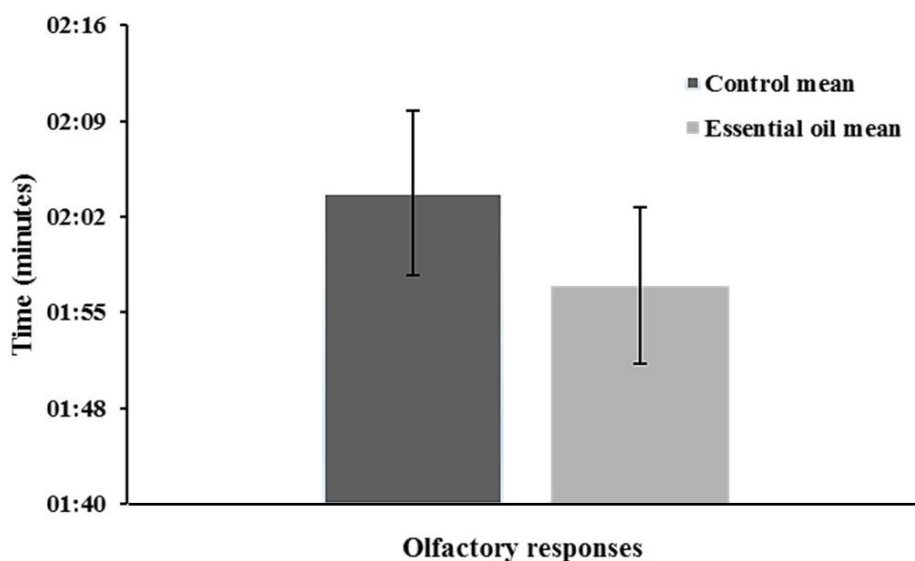
In olfactometer tests, only those individuals who responded by choosing one of the olfactometer arms were considered as the answer. In this case, the response of 34 mites was used in the statistical analysis. There was statistical difference, demonstrating that the mites were able to differentiate the control side of the essential oil side (Test  $\chi^2 = 16,333$ , GL = 1,  $p < 0.0001$ ).

283

284

285

Regarding the response time of females, there was no statistical difference between the two treatments ( $t = 0.27838$ , GL = 46,  $p = 0.391$ ) (Figure 2).



286

287

288

289

290

291

292

293

294

295

296

297

298

299

300

301

302

303

**Figure 2.** Mean time (min: s) of adult *D. gallinae* females used to choose one of the olfactory stimuli; *Z. caribau* essential oil and control on the olfactometer arms in Y.

It was observed that *Z. caribauem* essential oil had a Preference Index (P.I.) of -0,58, a result lower than -0,10 and closer to -1,00, suggesting a repellent action of 79% in *Z. caribauem* essential oil. It is worth mentioning that this is the first report of the repellent activity of this species against *D. gallinae*.

The significant repellent effect presented by some plant species, as seen in the present work, has been pointed out as a very efficient way to avoid pest infestation in agricultural areas, since, they have potential to reduce the posture and damages in the planting that cause loss of productivity, benefiting farmers economically (Isman, 1997; Pirali and Silva, 2011).

In relation to the insect repellent activity of the *D. gallinae* mite, it is known that the essential oils can act in different ways in arthropods by their action through contact, ingestion, fumigation, attraction, repellency, food detergency and oviposition (Isman, 2006). They can also act on the digestive and neurological enzymes of these invertebrates (Isman, 2006).

304 Essential plant oils from the Rutaceae family are often made up of monoterpenes and  
305 sesquiterpenes. The monoterpenes and their derivatives sesquiterpenes, such as linalool,  
306 terpineol, camphor, selinene are reported to have antibacterial action, insect repellent and  
307 toxic activities (Cardile et al., 2009).

308 Thus, the presence of high concentrations of  $\alpha$ -panasinsene (12,75%), varidiflorene  
309 (11,23%),  $\beta$ -elemene (10,61%) and  $\beta$ -selinene (8,72%) in the essential oil of *Z. caribaeum*  
310 contributes to the antimicrobial, antioxidant and repellent properties, in addition, the same  
311 activities exhibited can be explained by the synergism between the main volatile components  
312 (Rota et al., 2008).

313 It is also emphasized that sesquiterpenes have biological properties of insect  
314 repellency, pollination and plant growth regulation (Dewick, 2009). The germacrene D  
315 compound, found in *Z. caribaeum* belonging to the sesquiterpene group, has little biological  
316 function, however, it has been reported with insecticidal activity against mosquitoes and  
317 repellent against aphids (Zhang and Schlyter, 2004).

318

## 319 **Conclusions**

320 In the chemical characterization of the essential oil of *Z. caribaeum* were identified 20  
321 compounds, all terpenoids, being 4 considered major:  $\alpha$ -panasinsene, varidiflorene,  $\beta$ -  
322 elemene and  $\beta$ -selinene. In relation to the antimicrobial activity the essential oil showed  
323 activity against 4 Gram positive strains: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis* and *B. subtilis*  
324 and 2 Gram negative strains, *S. enterica*: Enteritidis and Typhimurium. It also exhibited  
325 repellency against the *D. gallinae* red mite and was effective in capturing free radical DPPH,  
326 expressing values close to the synthetic antioxidant BHT. In-depth research is suggested in  
327 relation to its potential in the food industry and as an alternative for the control of pest  
328 organisms that are less aggressive to the environment and to humans. Subsequent studies

329 should be considered in order to employ techniques that promote the isolation of bioactive  
330 compounds as well as research concerning their synergistic effect for therapeutic purposes.

331

### 332 **Acknowledgements**

333 The authors are thankful to CAPES (government agency linked to the Brazilian Ministry of  
334 Education in charge of promoting high standards for post-graduate courses in Brazil),  
335 Araucária Foundation, and CNPq (National Council for Scientific and Technological  
336 Development) for their financial support.

337

### 338 **Conflict of Interests**

339 The author(s) have not declared any conflict of interests.

340

341

342

### 343 **References**

344

345 **Adams, R.P. (2007).** Identification of essential oil components by gas chromatography/mass  
346 spectrometry. London: Allured Pub. Corp, 804 pp.

347

348 **Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. and Idaomar, M. (2008).** Biological effects of  
349 essential oils – A review. Food Chem. Toxicol. 46(2): 446- 475.

350

351 **Boehme, A.K., Noletto, J.A., Haber, W.A. and Setzer, W.N. (2008).** Bioactivity and  
352 chemical composition of the leaf essential oils of *Zanthoxylum rhoifolium* and *Zanthoxylum*  
353 *setulosum* from Monteverde. Costa Rica. Nat. Prod. Res. 22(1): 31-36.

354

355 **Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Simin, N. and Anackov, G. (2006).** Characterization of the  
356 volatile composition of essential oils of some Lamiaceae spices and the antimicrobial and  
357 antioxidant activities of the entire oils. *J. Agric. Food Chem.* 54(5): 1822-1828.

358

359 **Burt, S. (2004).** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in  
360 foods – a review. *Int. J. Food Microbiol.*, 94(3): 223- 253.

361

362 **Cardile, V., Russo, A., Formisano, C., Rigano, D., Senatore, F., Arnold, N.A. and Piozzi,**  
363 **F. (2009).** Essential oils of *Salvia bracteata* and *Salvia rubifolia* from Lebanon: Chemical  
364 composition, antimicrobial activity and inhibitory effect on human melanoma cells. *J.*  
365 *Ethnopharmacol.* 126(2): 265–272.

366

367 **Chavan, M.J., Shinde, D.B. and Nirmal, A.S. (2006).** Major volatile constituents of *Annona*  
368 *squamosa* L. bark. *Nat. Prod. Res.* 20(8): 754-757.

369

370 **Dewick, P.M. (2009).** Medicinal natural products: a biosynthetic approach. 3 ed. England:  
371 John Wiley & Sons, 539 p.

372

373 **Dongmo, P.M.J., Tchoumboungang, F., Sonwa, E.T. and Menut, C. (2008).** Antioxidant  
374 and anti-inflammatory potential of essential oils of some *Zanthoxylum* (Rutaceae) of  
375 Cameroon. *Int. J. Essent. Oil Therap.* 2(1): 82-88.

376

377 **Durden, L.A., Linthicum, K.J. and Monath, T.P. (1993).** Laboratory transmission of  
378 Eastern Equine Encephalomyelitis virus to chickens by chicken mites (Acari:  
379 Dermanyssidae). J. Med. Entomol. 30(1): 281-285.

380

381 **Faroni, L.R.A., Molin, L., Andrade, E.T. and Cardoso, E.G. (1995).** Utilização de  
382 produtos naturais no controle de *Acanthoscelides obtectus* em feijão armazenado. Rev. Bras.  
383 Armaz. 20(1/2): 44-48.

384

385 **Gonzaga, W.A., Weber A.D., Giacomelli, S.R., Simionatto, E., Dalcol I.I., Dessoy, E.C.**  
386 **and Morel, A.F. (2003).** Composition and antibacterial activity of the essential oils from  
387 *Zanthoxylum rhoifolium*. Planta Med. 69(8): 773-775.

388

389 **Guy, I., Charles, B. and Guinaudeau, H. (2001).** Essential oils from leaves of two  
390 paraguayan Rutaceae: *Zanthoxylum hyemale* A. St. Hil. and *Z. naranjillo* Griseb. J. Essent.  
391 Oil Res., 13(1): 200-201.

392

393 **Holley, R.A. and Patel, D. (2005).** Improvement in shelf- life and safety of perishable foods  
394 by plant essential oils and smoke antimicrobials. Int. J. Food Microbiol. 22(4): 273-292.

395

396 **Iacobellis, N.S., Lo Cantore, P., Capasso, F. and Senatore, F. (2005).** Antibacterial activity  
397 of *Cuminum cyminum* L. and *Carum carvi* L. essential oils. J. Agric. Food Chem. 53(1): 57-  
398 61.

399

400 **Islam, S.K.N. and Ahsan, M. (1997).** Biological activities of the secondary metabolites  
401 isolated from *Zieria smithii* and *Zanthoxylum elephantiasis* on microorganisms and brine  
402 shrimps. *Phytother. Res.* 11(1): 64–66.

403

404 **Isman, M.B. (1997).** Neem and other botanical insecticides: barriers to commercialization.  
405 *Phytoparasitica.* 25(1): 339-334.

406

407 **Isman, M.B., (2006).** Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture  
408 and increasing regulated world. *Annu. Rev. Entomol.* 51(1):45-66.

409

410 **Juteau, F., Masotti, V., Bessière, J.M., Dherbomez, M. and Viano, J. (2002).** Antibacterial  
411 and antioxidant activities of *Artemisia annua* essential oil. *Fitoterapia.* 73(6): 532-535.

412

413 **Limberger, R.P., Sobral, M.E.G., Henriques, A.T., Menut, C. and Bessiere, J.M. (2004).**  
414 Essential oils from *Myrcia* species native to Rio Grande do Sul. *Quím. Nova.* 27(6): 916-919.

415

416 **Mimica-Dukić, N., Bozin, B., Soković, M., Mihajlović, B. and Matavulj, M. (2003).**  
417 Antimicrobial and antioxidant activities of three *Mentha* species essential oils. *Planta Med.*  
418 69(5): 413-419.

419

420 **Negi, J.S., Bisht, V.K., Bhandari, A.K., Bisht, R., Negi, S.K. (2012).** Major constituents,  
421 antioxidant and antibacterial activities of *Zanthoxylum armatum* DC. essential oil. *Iranian J.*  
422 *Pharm. Ther.* 11(2):68-72.

423



424 **Nogueira, J., Mourão, S.C., Dolabela, I.B., Santos, M.G., Mello, C.B., Kelecom, A.,**  
425 **Mexas, R., Feder, D., Fernandes, C.P., Gonzalez, M.S. and Rocha, L. (2014).**  
426 *Zanthoxylum caribaeum* (Rutaceae) essential oil: chemical investigation and biological  
427 effects on *Rhodnius prolixus* nymph. Parasitol. Res. 113(11): 4271-4279.  
428  
429 **Oliveira, R.A., Sá, I.C.G., Duarte, L.P. and Oliveira, F.F. (2011).** Volatile constituents of  
430 *Mentha pulegium* L. and *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. Rev. Bras. Plantas Med.  
431 13(2): 165-169.  
432  
433 **Owen, S.M. and Peñuelas, J. (2005).** Opportunistic emissions of volatile isoprenoids. Trends  
434 Plant Sci. 10(9): 420-426.  
435  
436 **Pandini, J.A., Pinto, F.G.S., Scur, M.C., Alves, L.F.A. and Martins, C.C. (2015).**  
437 Antimicrobial, insecticidal, and antioxidante activity of essential oil and extracts of *Guarea*  
438 *kunthiana* A. Juss. J. Med. Plants Res. 9(3): 48-55.  
439  
440 **Pirali-Kheirabadi, K.H. and Silva, J.A.T. (2011).** In-vitro assessment of the acaricidal  
441 properties of *Artemisia annua* and *Zataria multiflora* essential oils to control cattle ticks. Iran.  
442 J. Parasitol. 6(1): 58-65.  
443  
444 **Procópio, S.O., Vendramim, J.D., Ribeiro Júnior, J.I., and Santos J.B. (2003).** Bioactivity  
445 of powders from some plants on *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). Ciênc.  
446 Agrotec. 27(6): 1231-1236.  
447

448 **R Development Core Team (2010)**. A language and environment for statistical computing.  
449 [2.12.1]. Vienna, Austria, R Foundation for Statistical Computing.  
450

451 **Rajendran, S and Sriranjini, V. (2008)**. Plant products as fumigants for stored-product  
452 insect control. *J. Stored Prod. Res.* 44(1): 126-135.  
453

454 **Rota, M.C., Herrera, A., Martínez, R.M., Sotomayor, J.A. and Jordán, M.J. (2008)**.  
455 Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and  
456 *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control.* 19(7): 681-687.  
457

458 **Santos, T.G., Rebelo, R.A., Dalmarco, E.M., Guedes, A., Gasper, A.L., Cruz, A.B.,**  
459 **Schimit, A.P., Cruz, R.C.B., Steindel, M. and Nunes, R.K. (2012)**. Chemical composition  
460 and antimicrobial activity of leaf essential oil from *Piper malacophyllum* (C. Presl.) C. DC.  
461 *Quím. Nova.* 35(3): 477-481.  
462

463 **Sartoratto, A., Machado, A.L.M., Delarmelina, C.G.M.F., Duarte, M.C.T. and Rehder,**  
464 **V.L.G. (2004)**. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants  
465 used in Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 35(4): 275-280.  
466

467 **Setzer W.N., Noletto, J.A., Lawton, R.O. and Haber, W.A. (2005)**. Leaf essential oil  
468 composition of five *Zanthoxylum* species from Monteverde, Costa Rica. *Mol Divers.* 9(1-3):  
469 3-13.  
470

471 **Sikkema, J., De Bont, J.A.M. and Poolman, B. (1994)**. Interactions of cyclic hydrocarbons  
472 with biological membranes. *J. Biol. Chem.* 269(1): 8022-8028.

473

474 **Silva, C.V., Detoni, C.B., Velozo, E.S. and Guedes, M.L.S. (2008).** Alkaloids and other  
475 metabolites from stems and fruits of *Zanthoxylum tingoassuiba* A. St. Hil. Quim. Nova. 31(8):  
476 2052-2055.

477

478 **Solórzano-Santos, F. and Miranda-Navales, M.G. (2012).** Essential oils from aromatic  
479 herbs as antimicrobial agents. Curr. Opin. Biotechnol. 23(1): 136–141.

480

481 **Souza, E.L., Lima, E.O., Freire, K.R.L. and Sousa, C.P. (2005).** Inhibitory action of some  
482 essential oils and phytochemicals on the growth of various moulds isolated from foods. Braz.  
483 Arch. Biol. Technol. 48(2): 245-250.

484

485 **Spitaler, R., Schlorhauser P.D., Ellmerer, E.P., Merfort, I., Bortenschlager, S.,**  
486 **Stuppner, H. and Zidorn, C. (2006).** Altitudinal variation of secondary metabolite profiles  
487 in flowering heads of *Arnica montana* cv. ARBO. Phytochemistry. 67(1): 409-417.

488

489 **Trombetta, D., Castelli, F., Sarpietro, M.G., Venuti, V., Cristani, M., Daniele, C., Saija,**  
490 **A., Mazzanti, G. and Bisignano, G. (2005).** Mechanisms of antibacterial action of three  
491 monoterpenes. Antimicrob. Agents Chemother. 49(6): 2474-2478.

492

493 **Vieira, M.G.S., Freitas, J.V.B., Lima Neto, M.N., Gramosa, N.V. and Nunes, E.P. (2009).**  
494 Volatile chemical constituents of the leaves and twigs from *Zanthoxylum syncarpum* Tull.  
495 Quím. Nova. 32(2): 391-393.

496

497 **Wang, C.F., Yang, K., Zhang, H.M., Cao, J., Fang, R., Liu, Z.L., Du, S.S., Wang, Y.Y.,**  
498 **Deng Z.W. and Zhou, L. (2011).** Components and insecticidal activity against the maize  
499 weevils of *Zanthoxylum schinifolium* fruits and leaves. *Molecules*. 16(1): 3077–3088.

500

501 **Weber, L.D., Pinto, F.G.S., Scur, M. C., Souza, J.G.L, Costa, W.F. and Leite, C.W.**  
502 **(2014).** Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activity of essential oil and  
503 various plant extracts from *Prunus myrtifolia* (L.) Urb. *Afr. J. Agric. Res.* 9(9): 846-853.

504

505 **Zhang, Q.H. and Schlyter, F. (2004).** Olfactory recognition and behavioural avoidance of  
506 angiosperm nonhost volatiles by conifer-inhabiting bark beetles. *Agric. Florest Meteorol.*  
507 6(1): 1–19.

508

509

510

## Anexo 1 - Normas da Revista Cap. 1



### REVISTA BRASILEIRA DE SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL *Brazilian Journal of Animal Health and Production*

[www.rbspa.ufba.br](http://www.rbspa.ufba.br) [www.periodicos.capes.gov.br](http://www.periodicos.capes.gov.br)

[www.scielo.br/revistas/rbspa/pinstruc.htm](http://www.scielo.br/revistas/rbspa/pinstruc.htm)

71 32836725 [rbspa@ufba.br](mailto:rbspa@ufba.br)

Revista Brasileira De Saúde E Produção Animal – Rbspa

#### **ORIENTAÇÕES GERAIS:**

O periódico RBSPA é uma publicação eletrônica, com acesso e envio de artigos exclusivamente pela Internet ([www.rbspa.ufba.br](http://www.rbspa.ufba.br)). Editado na Universidade Federal da Bahia, destina-se a publicação de artigos de pesquisas científicas originais nas seguintes seções: Agronegócio; Forragicultura e pastagens; Medicina veterinária preventiva; Melhoramento genético animal; Morfofisiologia animal; Nutrição animal; Patologia e clínicas; Produção animal e ambiente; Recursos pesqueiros/aqüicultura; e Reprodução animal. **Revisões de literatura abrangendo assuntos nas mesmas seções, eventualmente são avaliadas, exclusivamente, por convite do Conselho Editorial.**

Os artigos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Conselho Editorial, com assessoria de especialistas da área (revisores *ad hoc*). Os pareceres têm caráter imparcial e sigilo absoluto, tanto da parte dos autores como dos revisores, sem identificação entre eles. Os artigos, cujos textos necessitam de revisões ou correções, são devolvidos aos autores e, se aceitos para publicação, passam a ser de propriedade da RBSPA. Os conceitos, informações e conclusões constantes dos trabalhos são de exclusiva responsabilidade dos autores.

Os manuscritos devem ser redigidos na forma impessoal, espaço entre linhas duplo (exceto nas tabelas e figuras), fonte Times New Roman tamanho 12, em folha branca formato A4 (21,0 X 29,7 cm), com margens de três cm, páginas numeradas seqüencialmente em algarismos arábicos, não excedendo a 20, incluindo tabelas e figuras (inclusive para artigos de revisão). As páginas devem apresentar linhas numeradas. A numeração é feita da seguinte forma: menu arquivo/ configurar página/ layout/ números de linha.../ numerar linhas).

Não utilizar abreviações não-consagradas e acrônimos, tais como: "o T2 foi menor que o T4, e não diferiu do T3 e do T5". Quando se usa tal redação dificulta-se o entendimento do leitor e a fluidez do texto. Evite siglas desnecessárias em todo o texto.

**Citações no texto:** são mencionadas com a finalidade de esclarecer ou completar as idéias do autor, ilustrando e sustentando afirmações. Toda documentação consultada deve ser obrigatoriamente citada em decorrência aos direitos autorais. As citações de autores no texto são em letras minúsculas, seguidas do ano de publicação. Quando houver dois autores, usar & (e comercial) e, no caso de três ou mais autores, citar apenas o sobrenome do primeiro, seguido de et al.

(não-italico). Menciona-se a data da publicação que deverá vir citada entre parênteses, logo após o nome do autor. As citações feitas no final do parágrafo devem vir entre parênteses e separadas por ponto e vírgula, em ordem cronológica. O artigo **não** deve possuir referências bibliográficas oriundas de publicações em eventos técnico- científicos (anais de congressos, simpósios, seminários e similares), bem como teses, dissertações e publicações na internet (que não fazem parte de periódicos científicos). Deve-se, então, privilegiar artigos publicados em periódicos com corpo editorial (observar orientações percentuais e cronológicas no último parágrafo do item “Referências”).

**Citação de citação** (apud): não é aceita.

**Língua:** Os artigos submetidos poderão ser na língua Portuguesa, Inglesa ou Espanhola.

**Entretanto, se aceitos para publicação será obrigatória a tradução para o inglês com apresentação do certificado de tradução por empresas credenciadas pela RBSPA. As despesas de tradução serão por conta dos autores.**

**Os artigos enviados para a revista até setembro/2015 que estão em tramitação poderão ser publicados em português, entretanto, se traduzidos para o inglês terão prioridade na publicação.**

Todos os artigos, após o aceite deverão estar acompanhados (como documento suplementar) do comprovante de tradução ou correção de um dos seguintes tradutores: American Journal Experts

Editage

Elsevier

<http://www.proof-reading-service.com>

<http://www.academic-editing-services.com/>

<http://www.publicase.com.br/formulario.as>

p

**Tabela:** deve ser mencionada no texto como Tabela (por extenso) e refere-se ao conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. São construídas apenas com linhas horizontais de separação no cabeçalho e ao final da tabela. A legenda recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico (Ex.: Tabela 1. Ganho médio diário de ovinos alimentados com

fontes de lipídeos na dieta). O título da tabela deve ser formatado de maneira que, a partir da segunda linha, o texto se inicie abaixo da primeira letra do título e não da palavra Tabela. Ao final do título não deve conter ponto final. Não são aceitos quadros.

**Figura:** deve ser mencionada no texto como Figura (por extenso) e refere-se a qualquer ilustração constituída ou que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma esquema etc. Os desenhos, gráficos e similares devem ser feitos com tinta preta, com alta nitidez. As fotografias, no tamanho de 10 × 15 cm devem ser nítidas e de alto contraste. As legendas recebem inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico (Ex.: Figura 1. Produção de leite de vacas Gir sob estresse térmico nos anos de 2005 e 2006). Chama-se a atenção para as proporções entre letras, números e dimensões totais da figura: caso haja necessidade de redução, esses elementos também são reduzidos e correm o risco de ficar ilegíveis. O título da figura deve ser formatado de maneira que a partir da segunda linha o texto se inicie abaixo da primeira letra do título e não da palavra Figura. Igualmente, ao final do título não deve conter ponto final. Tanto as tabelas quanto as figuras devem vir o mais próximo possível, após sua chamada no texto.

#### **TIPOS E ESTRUTURA DE ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO:**

1) **Artigos científicos:** devem ser divididos nas seguintes seções: título, título em inglês, autoria, resumo, palavras-chave, summary, keywords,

introdução, material e métodos, resultados e discussão, agradecimentos (opcional) e referências;

2) **Artigos de revisão:** devem conter: título, título em inglês, autoria, resumo, palavras-chave, summary, keywords, introdução, desenvolvimento, conclusões, agradecimentos (opcional) e referências.

Os títulos de cada seção devem ser digitados em negrito, justificados à esquerda e em letra maiúscula.

**Título:** Em português (negrito) e em inglês (itálico), digitados somente com a primeira letra da sentença em maiúscula e centralizados. Devem ser concisos e indicar o conteúdo do trabalho. Evitar termos não significativos como “estudo”, “exame”, “análise”, “efeito”, “influência”, “avaliação” etc. Não ultrapassar 20 termos.

**Autores:** A nomeação dos autores deve vir logo abaixo do título em inglês. Digitar o último sobrenome em maiúsculo, seguido pelos pré-nomes (com apenas a primeira letra maiúscula) também por extenso e completo, separados por vírgula e centralizados (Ex.: OLIVEIRA, João Marques de). A cada autor deverá ser atribuído um número arábico sobrescrito ao final do sobrenome, que servirá para identificar as informações referentes a ele. Logo abaixo dos nomes dos autores, deverá vir justificada a esquerda e em ordem crescente a numeração correspondente, seguida pela afiliação do autor: Instituição; Unidade; Departamento; Cidade; Estado e País. Deve estar indicado o autor para correspondência com o respectivo endereço eletrônico.

**Resumo e Summary:** Devem conter entre 200 e 250 palavras cada um, em um só parágrafo. Não repetir o título. Cada frase deve ser uma informação e não apresentar citações. Deve se iniciar pelos objetivos, breve metodologia, apresentar os resultados seguidos pelas conclusões. Toda e qualquer

sigla deve vir precedida da explicação por extenso. Ao submeter artigos em outra língua, deve constar o resumo em português.

**Palavras-chave e keywords:** Entre três e cinco, devem vir em ordem alfabética, separadas por vírgulas, sem ponto final, com informações que permitam a compreensão e a indexação do trabalho. Não são aceitas palavras-chave que já constem do título.

**Introdução:** Deve conter no máximo 2.500 caracteres com espaços. Explicação de forma clara e objetiva do problema investigado, sua pertinência, relevância e, ao final, os objetivos com a realização do trabalho.

**Material e Métodos:** (exceto para artigos de revisão): Não são aceitos subtítulos. Devem apresentar seqüência lógica da descrição do local, do período de realização da pesquisa, dos tratamentos, dos materiais e das técnicas utilizadas, bem como da estatística utilizada na análise dos dados. Técnicas e procedimentos de rotina devem ser apenas referenciados. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente deve apresentar parecer de aprovação pelo Comitê de Ética e Biossegurança da instituição.**

**Resultados e Discussão** (exceto para artigos de revisão): Os resultados podem ser apresentados como um elemento do texto ou juntamente com a discussão, em texto corrido ou mediante ilustrações. Interpretar os resultados no trabalho de forma consistente e evitar comparações desnecessárias. Comparações, quando pertinentes, devem ser discutidas e feitas de forma a facilitar a compreensão do leitor. **As conclusões são obrigatórias, devem ser apresentadas ao final da discussão e não como item independente.** Não devem ser repetição dos resultados e devem responder aos objetivos expressos no artigo. Desenvolvimento (exclusivo para artigos de revisão): Deve ser escrita de forma crítica, apresentando a evolução do

conhecimento, as lacunas existentes e o estado atual da arte com base no referencial teórico disponível na literatura consultada.

**Agradecimentos:** Devem ser escritos em itálico e o uso é opcional.

**Referências:** Devem ser relacionadas em ordem alfabética pelo sobrenome e contemplar todas aquelas citadas no texto. Menciona-se o último sobrenome em maiúsculo, seguido de vírgula e as iniciais abreviadas por pontos, sem espaços. Os autores devem ser separados por ponto e vírgula. Digitá-las em espaço simples, com alinhamento justificado a esquerda. As referências devem ser separadas entre si (a separação deve seguir o caminho parágrafo/espacamento e selecione: depois seis pontos). O recurso tipográfico utilizado para destacar o elemento título será negrito e, para os nomes científicos, itálico. São adotadas as normas ABNT-NBR-6023 - agosto de 2002.

No mínimo **70%** das referências devem ser de artigos publicados nos últimos dez anos. Não serão permitidas referências de **livros, anais, internet, teses, dissertações, monografias**, exceto que seja justificada a sua inserção no artigo e desde que não exceda **30%** do total.

#### **ORIENTAÇÃO E EXEMPLO PARA REFERÊNCIA:**

**Periódicos:** Os títulos dos periódicos devem ser mencionados sem abreviações e em negrito. Não é necessário citar o local, somente o volume, o número, o intervalo de páginas e o ano.

MELO, T.V.; FURLAN, R.L.; MILANI, A.P.; BUZANSKAS, M.E.; MOURA, A.M.A. de; MOTA, D.A. Roof pitch and exposure and different roofing materials in reduced models of animal production facilities in the fall and winter. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal** [online], v.16, n.3, p.658-666, 2015.

#### **INFORMAÇÕES ADICIONAIS**

A RBSPA adota como padrão de atribuição de acesso aberto dos artigos a licença CC-BY.

#### **O QUE ENVIAR PARA A REVISTA:**

Os trabalhos para publicação são enviados exclusivamente por meio eletrônico pelo

endereço [www.rbspa.ufba.br](http://www.rbspa.ufba.br). Serão considerados viáveis para publicação apenas os artigos cujos autores cumprirem todas as etapas a seguir, enviando:

1. Um arquivo com o texto do artigo no campo de submissão de artigos ([www.rbspa.ufba.br](http://www.rbspa.ufba.br)) com as ilustrações (se houver) em P/B.

2. Formulário de Encaminhamento de Artigo, preenchido e enviado pelo e-mail do autor responsável ([http://www.rbspa.ufba.br/forms/form\\_encam\\_artigo.doc](http://www.rbspa.ufba.br/forms/form_encam_artigo.doc)).

3. Comprovante de pagamento da taxa de encaminhamento do artigo (**etapa inicial do processo**) no valor de R\$ 50,00 (cinquenta reais) via fax ou escaneado.

É indispensável apresentação deste comprovante juntamente ao Formulário de Encaminhamento devidamente preenchido para que o artigo siga tramitação.

4. Comprovante de pagamento da taxa de publicação (**etapa conclusiva do processo**) via fax ou escaneado.

**Taxa de publicação:** quando da aprovação (prelo) serão orientados ao pagamento da Guia de Recolhimento da União (GRU), no valor de R\$220,00. (duzentos e vinte reais).

#### **INFORMAÇÕES PARA CONTATO:**

Telefone: (71) 32836725

Fax: (71) 32836718

E-mail: [rbspa@ufba.br](mailto:rbspa@ufba.br)

Site:

[www.rbspa.ufba.br](http://www.rbspa.ufba.br)



## Anexo 2 - Normas da Revista Cap. 2

### Journal Of Essential Oil Bearing Plants

#### Instructions for authors

Thank you for choosing to submit your paper to us. These instructions will ensure we have everything required so your paper can move through peer review, production and publication smoothly. Please take the time to read and follow them as closely as possible, as doing so will ensure your paper matches the journal's requirements. For general guidance on the publication process at Taylor & Francis please visit our [Author Services website](#).



#### SCHOLARONE MANUSCRIPTS™

This journal uses ScholarOne Manuscripts (previously Manuscript Central) to peer review manuscript submissions. Please read the [guide for ScholarOne authors](#) before making a submission. Complete guidelines for preparing and submitting your manuscript to this journal are provided below.

#### Regular

#### articles

These should describe new and carefully confirmed findings, and experimental procedures should be given in sufficient detail for others to verify the work. The length of a full paper should be the minimum required to describe and interpret the work clearly.

#### Short

#### Communications

A Short Communication is suitable for recording the results of complete small investigations or giving details of new models or hypotheses, innovative methods, techniques or apparatus. The style of main sections need not conform to that of full-length papers. Short communications are 2 to 5 printed pages (about 6 to 15 manuscript pages) in length.

#### Reviews

Submissions of reviews and perspectives covering topics of current interest are welcome and encouraged. Reviews should be concise and no longer than 4-12 printed pages (about 12 to 36 manuscript pages).

#### Peer

#### review

All papers are subject to peer review. The Journal has an identified panel of reviewers and will also seek additional reviewers as the topic of a paper requires.

#### Citations

Please note that all papers accepted for this journal are subject to originality checking. To avoid potential problems, please ensure that all citations are fully disclosed at the point of submission. [View guide to correct citations.](#)

## **Regular**

## **articles**

All portions of the manuscript must be typed double-spaced and all pages numbered starting from the title page. The Title should be a brief phrase describing the contents of the paper. The Title Page should include the authors' full names and affiliations, the name of the corresponding author along with phone, fax and E-mail information. Present addresses of authors should appear as a footnote. The Abstract should be informative and completely self-explanatory, briefly present the topic, state the scope of the experiments, indicate significant data, and point out major findings and conclusions.

The Abstract should be 100 to 300 words in length. Complete sentences, active verbs, and the third person should be used, and the abstract should be written in the past tense. Standard nomenclature should be used and abbreviations should be avoided. No literature should be cited.

Following the abstract, about 3 to 10 key words that will provide indexing references should be listed.

A list of non-standard Abbreviations should be added. In general, non-standard abbreviations should be used only when the full term is very long and used often. Each abbreviation should be spelled out and introduced in parentheses the first time it is used in the text. Only recommended SI units should be used. Authors should use the solids presentation (mg/ml). Standard abbreviations (such as ATP, cGMP, DNA and RNA) need not be defined.

The Introduction should provide a clear statement of the problem, the relevant literature on the subject, and the proposed approach or solution. It should be understandable to colleagues from a broad range of scientific disciplines.

Materials and methods should be complete enough to allow experiments to be reproduced. However, only truly new procedures should be described in detail; previously published procedures should be cited, and important modifications of published procedures should be mentioned briefly. Capitalize trade names and include the manufacturer's name and address. Subheadings should be used. Methods in general use need not be described in detail.

Results should be presented with clarity and precision. The results should be written in the past tense when describing findings in the authors' experiments. Previously published findings should be written in the present tense. Results should be explained, but largely without referring to the literature. Discussion, speculation and detailed interpretation of data should not be included in the Results but should be put into the Discussion section.

The Discussion should interpret the findings in view of the results obtained in this and in past studies on this topic. State the conclusions in a few sentences at the end of

the paper. The Results and Discussion sections can include subheadings, and when appropriate, both sections can be combined.

The Acknowledgments of people, grants, funds, etc should be brief.

Tables should be kept to a minimum and be designed to be as simple as possible. Tables are to be typed double-spaced throughout, including headings and footnotes. Each table should be on a separate page, numbered consecutively in Arabic numerals and supplied with a heading and a legend. Tables should be self-explanatory without reference to the text. The details of the methods used in the experiments should preferably be described in the legend instead of in the text. The same data should not be presented in both table and graph form or repeated in the text.

Figure legends should be typed in numerical order on a separate sheet. Graphics should be prepared using applications capable of generating high resolution GIF, TIFF, JPEG or PowerPoint before pasting in the Microsoft Word manuscript file. Tables should be prepared in Microsoft Word. Use Arabic numerals to designate figures and upper case letters for their parts (Figure 1). Begin each legend with a title and include sufficient description so that the figure is understandable without reading the text of the manuscript. Information given in legends should not be repeated in the text.

## References

In the text, a reference identified by means of an author's name should be followed by the date of the reference in parenthesis. When there are more than two authors, only the first author's name should be mentioned, followed by 'et al'(Verma, et.al., 2010). In the event that an author cited has had two or more works published during the same year, the reference, both in the text and in the reference list, should be identified by a lower case letter like 'a' and 'b' after the date to distinguish the works. The list of references should be on separate page. Authors bear the complete responsibility for the accuracy of the references. The following examples illustrate the format for reference

**Pande, C. and Mathela, C.S. (2000).** Chemical composition of the leaf oil of *Juniperus communis* L. from the Kumaon region. *J. Essential oil Bearing Plants.* 3(3): 135-138.

**Kaur, S., Dayal, R., Varshney, V.K. and Bartley, J. P. (2001).** GC-MS analysis of essential oils of heartwood and resin of shore robusta. *Planta Med.* 67: 883-886.

**Adams, R.P. (1991).** Cedar wood oil-analysis and properties in: *Modern Methods of Plant Analysis-oils and waxes.* Linsking H.F and Jackson, J.E.(eds.) Springer Verlag, Lennin,? pp.

**Adams, R.P. (1995).** Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. Allured Publishing Co. Carol Stream, Illinois.

## Short

## Communications

Short Communications are limited to a maximum of two figures and one table. They should present a complete study that is more limited in scope than is found in full-

length papers. The items of manuscript preparation listed above apply to Short Communications with the following differences: (I) Abstracts are limited to 120 words; (II) instead of a separate Materials and Methods section, experimental procedures may be incorporated into Figure Legends and Table footnotes; (III) Results and Discussion should be combined into a single section.

### **Proofs and Reprints**

Electronic proofs will be sent (e-mail attachment) to the corresponding author as a PDF file. Page proofs are considered to be the final version of the manuscript. With the exception of typographical or minor clerical errors, no changes will be made in the manuscript at the proof stage. An e-copy (PDF file) of the published article will be sent to the corresponding author.

### **Copyright**

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before (except in the form of an abstract or as part of a published lecture, or thesis) that it is not under consideration for publication elsewhere; that if and when the manuscript is accepted for publication, the authors agree to automatic transfer of the copyright to the publisher.

### **Publication Charges**

Publication charges are applicable for all articles published in *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. The charges are **\$125USD** for each accepted article, with a reduced rate of **\$75USD** for authors from SAARC member nations (Bangladesh, Bhutan, India, Maldives, Nepal, Pakistan, and Sri Lanka). Publication charges may be reduced/waived at the discretion of Har Krishan Bhalla & Sons.