



CHRISTIANE RICALDONI GIVIZIEZ

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS
ESSENCIAIS DE *Piper aduncum*, *Piper
hispidinervum* e *Syzygium aromaticum* e
DESENVOLVIMENTO DE UM ANTISSÉPTICO
COM PRINCÍPIO ATIVO NATURAL**

**LAVRAS-MG
2010**

CHRISTIANE RICALDONI GIVIZIEZ

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Piper aduncum*, *Piper hispidinervum* e *Syzygium aromaticum* e
DESENVOLVIMENTO DE UM ANTISSEPTICO COM PRINCÍPIO
ATIVO NATURAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador
Prof. Dr. Luís Roberto Batista

**LAVRAS - MG
2010**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Giviziez, Christiane Ricaldoni.

Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de *Piper aduncum*,
Piper hispidinervum e *Syzygium aromaticum* e desenvolvimento de
um antisséptico com princípio ativo natural / Chrsitiane Ricaldoni
Giviziez. – Lavras : UFLA, 2010.

124 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Luís Roberto Batista.

Bibliografia.

1. Potencial biocida. 2. Higiene. 3. Agentes antissépticos. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 576

CHRISTIANE RICALDONI GIVIZIEZ

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Piper aduncum*, *Piper hispidinervum* e *Syzygium aromaticum* e
DESENVOLVIMENTO DE UM ANTISSEPTICO COM PRINCÍPIO
ATIVO NATURAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 26 de maio de 2010

Profa. Dra. Maria das Graças Cardoso UFLA

Profa. Dra. Ivana Aparecida da Silveira UNILAVRAS

Proaf. Dra. Andréia Peraro do Nascimento UNILAVRAS

Prof. Dr. Luís Roberto Batista
UFLA
(Orientador)

**LAVRAS – MG
2010**

A Deus, pela minha existência.

Aos meus pais, Rilmo (sempre presente) e Regina, pelo incentivo, exemplo e carinho.

Aos meus irmãos, Erik e Philipe, pela amizade, confiança e apoio.

Ao meu marido, Wendy, pelo companheirismo, cumplicidade, incentivo e constantes demonstrações de amor.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, à Nossa Senhora e a Dom Bosco, por todas as oportunidades que tive e que tenho em minha vida, pela proteção e amparo em todos os momentos.

Ao meu orientador, Dr. Luís Roberto Batista, amigo que me compreende, me estimula e me enriquece com sua presença, seu saber e sua ternura.

À professora Dr. Maria das Graças Cardoso, pela coorientação e pela disposição de sempre me ajudar.

À professora mestre Karla de Miranda Figueiredo Furtado e à Farmácia Escola Verde Vida, do Centro Universitário de Lavras, pela oportunidade, cooperação e ensinamentos.

A minha família, exemplo de união, amor e cooperação, e que sempre me apoiou em toda a minha caminhada. Agradeço ao meu pai, Rilmo (sempre presente), meu anjo, ser iluminado e a minha mãe, Regina que me ensinou a amar a vida, amo tudo em ti. Obrigada, mãe querida, por tudo que tem me dado, pelos ensinamentos. Só tenho a agradecer, pelo meu passado, presente e futuro, aos meus irmãos, Érik e Philipe, motivo de orgulho e admiração. Amo vocês do fundo do meu coração.

A minha avó, Laura Pomárico, pelo seu vigor físico, raciocínio lógico e sabedoria, tesouro de valor inestimável, exemplo de vida, ternura e dedicação, a quem eu devo toda a minha gratidão. Minha tia Belinha e minhas primas Cecília e Marcela, por todo carinho e apoio sempre prestados.

Ao meu marido, companheiro e amigo, Wendy Carniello Ferreira, por seu apoio e dedicação, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho. Agradeço muito a você, meu amor, que está comigo sempre que eu preciso... Obrigada por continuar a me amar e apoiar, mesmo nos momentos de minha ausência. Agradeço a Deus cada momento que passo com você.

A família Carniello Ferreira, Isaias, Eleuza, Weiky e agora Maninho, e em especial a minha sogrita querida, Eleuza, agradeço pela fé inabalável que você demonstra durante as adversidades da vida. Amo vocês.

Às amigas do Laboratório de Micotoxinas e Micologia do DCA, Mariana, Daiani, Elizângela, Camila, Fabiana, Mônica, Michele, Ábia, Josiane e Taís e, em especial a Fabiana Couto, por todo o carinho e pela ajuda no decorrer do experimento.

Aos colegas do Laboratório de Química Orgânica, Aline, Luiz Gustavo, Juliana e em especial Milene, pelo apoio sempre prestado.

Aos amigos do Centro Universitário de Lavras, Ivana, Emília, Ju, Sabrina, Wilson e Alzira, por todo incentivo e anos especiais de convivência.

Aos amigos de Lavras, Jô, Gustavo, Paola e Giane, que acreditaram em minhas conquistas e realizações, serei eternamente grata.

À Universidade Federal de Lavras, ao Departamento de Ciência dos Alimentos e ao Laboratório de Química Orgânica, que me permitiram realizar este trabalho.

À Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia "André Tosello", pelo fornecimento das bactérias utilizadas neste trabalho.

Enfim, a todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para realização desta conquista.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro ao projeto Desenvolvimento de antisséptico e desinfetante com princípio ativo de óleo essencial (Projeto n°:472826/2008-5).

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1: Introdução geral	18
1	INTRODUÇÃO	19
2	REFERENCIAL TEÓRICO	21
2.1	Manipulação higiênica de alimentos	21
2.1.1	Higiene das mãos	23
2.2	Agentes antissépticos.....	24
2.3	Microrganismos envolvidos em surtos de intoxicação alimentar ...	25
2.3.1	<i>Aeromonas hydrophila</i>	26
2.3.2	<i>Escherichia coli</i>	26
2.3.3	<i>Listeria monocytogenes</i>	27
2.3.4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28
2.3.5	<i>Salmonella typhi</i>	29
2.3.6	<i>Staphylococcus aureus</i>	30
2.4	Contaminação microbiológica por fungos filamentosos e leveduras	31
2.4.1	<i>Aspergillus flavus</i>	32
2.4.2	<i>Aspergillus fumigatus</i>	32
2.4.3	<i>Aspergillus niger</i>	33
2.4.4	<i>Aspergillus parasiticus</i>	33
2.4.5	<i>Candida albicans</i>	33
2.4.6	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	34
2.4.7	<i>Penicillium brevicompactum</i>	34
2.4.8	<i>Penicillium citrinum</i>	35

2.4.9	<i>Penicillium solitum</i>	35
2.5	Plantas aromáticas, condimentares e medicinais	35
2.5.1	Óleos essenciais	37
2.5.2	Aspectos relacionados ao mecanismo de ação antimicrobiana de óleos essenciais	39
2.6	Espécie <i>Piper aduncum</i> (pimenta-de-macaco)	41
2.8	Espécie <i>Syzygium aromaticum</i> (cravo-da-índia) REFERÊNCIAS	46 49
	CAPÍTULO 2: Caracterização química e potencial biocida dos óleos essenciais de <i>Piper aduncum</i>, <i>Piper hispidinervum</i> e <i>Syzygium aromaticum</i> sobre microrganismos patogênicos e toxigênicos importantes para a indústria de alimentos	60
1	INTRODUÇÃO	64
2	MATERIAL E MÉTODOS	67
2.1	Material vegetal	67
2.2	Óleos essenciais	67
2.2.1	Extração dos óleos	67
2.2.2	Determinação da umidade	68
2.2.3	Identificação e quantificação dos constituintes dos óleos essenciais..	68
2.3	Potencial biocida dos óleos essenciais	70
2.3.1	Microrganismos	70
2.3.2	Manutenção e ativação dos microrganismos testados	70
2.3.3	Efeito biocida dos óleos essenciais sobre bactérias e levedura	70
2.3.4	Efeito biocida dos óleos essenciais sobre fungos filamentosos	71
2.3.5	Avaliação do efeito biocida	71
2.3.6	Análise estatística	72

3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
3.1	Óleos essenciais	73
3.1.1	Rendimento	74
3.1.2	Identificação e quantificação dos constituintes dos óleos essenciais.	75
3.1.2.1	Identificação e quantificação dos constituintes do óleo essencial de <i>Piper aduncum</i>	75
3.1.2.2	Identificação e quantificação dos constituintes do óleo essencial de <i>Piper hispidinervum</i>	77
3.1.2.3	Identificação e quantificação dos constituintes do óleo essencial de <i>Syzygium aromaticum</i>	78
3.1.3	Atividade antimicrobiana	80
4	CONCLUSÃO	84
	REFERÊNCIAS	86
	CAPÍTULO 3: Desenvolvimento e perfil de sensibilidade do antisséptico com princípio ativo de óleo essencial de <i>Syzygium aromaticum</i> frente a bactérias patogênicas	92
1	INTRODUÇÃO	95
2	MATERIAL E MÉTODOS	97
2.1	Elaboração do gel neutro e do antisséptico	97
2.2	Avaliação do perfil de sensibilidade do antisséptico com princípio ativo de óleo essencial de <i>Syzygium aromaticum</i> frente a bactérias patogênicas in vitro	97
2.3	Avaliação da eficiência do antisséptico com princípio ativo de óleo essencial de <i>Syzygium aromaticum</i> na redução da contaminação bacteriana natural das mãos	99
2.4	Análise estatística	100

3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	101
3.1	Perfil de sensibilidade do antisséptico com princípio ativo de óleo essencial de <i>S. aromaticum</i> frente aos microrganismos patogênicos	101
3.2	Perfil de sensibilidade do antisséptico com princípio ativo de óleo essencial de <i>S. aromaticum</i> na redução da contaminação bacteriana natural das mãos	102
4	CONCLUSÃO	108
	REFERÊNCIAS.....	109
	APÊNDICES	112

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo biossintético dos metabólitos secundários.	39
Figura 2	Aspecto de <i>Piper aduncum</i> , sendo (A) inflorescência (B) folhas frescas.	43
Figura 3	Estrutura química do dilapiol.	44
Figura 4	Aspecto de <i>Piper hispidinervum</i> , sendo (A) inflorescência (B) folhas frescas.....	45
Figura 5	Estrutura química do safrol.....	46
Figura 6	Aspecto de <i>Syzygium aromaticum</i> , sendo (A) folhas e flores e (B) botões florais secos.....	47
Figura 7	Estrutura química do eugenol.	48
Figura 8	Estruturas químicas dos compostos majoritários presentes no óleo essencial de <i>Piper aduncum</i>	76
Figura 9	Estruturas químicas dos compostos majoritários presentes no óleo essencial de <i>Piper hispidinervum</i>	77
Figura 10	Estruturas químicas dos compostos majoritários presentes no óleo essencial de <i>Syzygium aromaticum</i>	79
Figura 11	Fotografia do efeito inibitório (A) Efeito inibitório de <i>S. aromaticum</i> sobre <i>S. aureus</i> (B) Efeito inibitório de <i>S. aromaticum</i> sobre <i>E.coli</i> (C) Efeito inibitório de <i>P. hispidinervum</i> sobre <i>C. cladosporioides</i>	83
Figura 12 A)	<i>Escherichia coli</i> em meio Miller Hinton; B) ausência de crescimento de <i>E. coli</i> frente ao antisséptico com princípio ativo de óleo essencial de <i>Syzygium aromaticum</i>	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Rendimentos dos óleos essenciais de <i>Piper hispidinervum</i> , <i>Piper aduncum</i> e <i>Syzygium aromaticum</i> em base livre de umidade (% p/p BLU).....	74
Tabela 2	Composição química do óleo essencial das folhas frescas de <i>Piper aduncum</i>	76
Tabela 3	Composição química do óleo essencial das folhas frescas de <i>Piper hispidinervum</i>	77
Tabela 4	Composição química do óleo essencial dos botões florais secos de <i>Syzygium aromaticum</i>	79
Tabela 5	A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de <i>Piper aduncum</i> , <i>Piper hispidinervum</i> e <i>Syzygium aromaticum</i>	80
Tabela 6	Perfil de sensibilidade do antisséptico com princípio ativo de óleo essencial de <i>S. aromaticum</i> frente aos microrganismos patogênicos, nos tempos de 5 e 15 minutos.....	101
Tabela 7	Unidades formadoras de colônia por cm ² da palma das mãos, antes e após a higienização.	103
Tabela 8	Médias de reduções percentuais da contagem total após a higienização das mãos com sabão líquido, antisséptico alcoólico e antisséptico com princípio ativo de óleo essencial de <i>S. aromaticum</i>	106

RESUMO GERAL

Os óleos essenciais têm apresentado atividade biológica e servem como uma fonte alternativa de agentes antimicrobianos. Nesse contexto, este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar o potencial biocida dos óleos essenciais de *Piper hispidinervum*, *Piper aduncum* e *Syzygium aromaticum*, bem como desenvolver e avaliar o perfil de sensibilidade do antisséptico com princípio ativo de óleo essencial de *Syzygium aromaticum*, frente a bactérias patogênicas *in vitro* e na redução da contaminação bacteriana natural das mãos. A obtenção do óleo essencial foi realizada pela técnica de hidrodestilação, utilizando o aparelho de Clevenger modificado e a identificação e a quantificação dos constituintes, pelas análises em CG/EM e CG-DIC. A atividade biológica dos óleos essenciais nas bactérias patogênicas foi determinada pela técnica de perfuração em ágar. Para o efeito inibitório dos fungos filamentosos, foi utilizado o teste de difusão em disco. Para verificar a sensibilidade ao antisséptico desenvolvido com 6,3% de óleo essencial de *S. aromaticum*, foi utilizada a etapa *in vitro*, em que foi constatada a ação antimicrobiana frente às bactérias *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* e *Staphylococcus aureus*. Isto também se repetiu no teste nas mãos, em que foi aplicado o antisséptico elaborado com óleo essencial de *S. aromaticum* sobre as mãos naturalmente contaminadas. Nas análises cromatográficas, os constituintes majoritários encontrados no óleo essencial de *Piper aduncum* foram (E)-nerolidol (19,30%) e trans-sabineno hidratado (18,79%); no óleo de *Piper hispidinervum*, o safrol (73,44%) e p-menta-2,4(8)-dieno (18,78%) e, no óleo de *Syzygium aromaticum*, o eugenol (89,08%). O resultado da concentração mínima inibitória demonstrou que todos os microrganismos testados apresentaram sensibilidade ao óleo de *S. aromaticum*. O óleo de *P. Hispidinervum* foi mais eficiente para os fungos e o óleo essencial de *P. aduncum* foi o que apresentou menor atividade antimicrobiana. Nos dados obtidos *in vitro* e na antisepsia das mãos, o antisséptico com princípio ativo de óleo essencial de *S. aromaticum* mostrou-se eficaz contra os microrganismos, nos diferentes tempos avaliados.

Palavras-chave: Atividade antimicrobiana. Antisséptico. Microrganismos.

GENERAL ABSTRACT

Essential oils have shown biological activity and serve as an alternative source of antimicrobial agents. Therefore, this study aimed to evaluate the biocide potential of essential oils of *Piper hispidinervum*, *Piper aduncum* and *Syzygium aromaticum*, as well to develop and to evaluate the profile of sensitivity of the antiseptic with active principle of essential oil of *Syzygium aromaticum* against pathogenic bacteria *in vitro* and in reducing the natural bacterial contamination of the hands. The obtainment of essential oil was performed by hydrodistillation technique using the modified Clevenger apparatus, and the identification and quantification of the constituents by analysis in GC / MS and GC-FID. The biological activity of essential oils on pathogenic bacteria was determined by Agar Perforating technique. For the inhibitory effect of filamentous fungi, it was used the disk diffusion test. To check the sensitivity to the antiseptic developed with 6.3% of essential oil of *S. aromaticum*, it was used *in vitro* stage, where it was detected the antimicrobial action on the bacteria *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* and *Staphylococcus aureus*. This also happened in the hand test, which was applied antiseptic formulated with essential oil of *S. aromaticum* on naturally contaminated hands. In chromatographic analyzes, the major constituents found in essential oil of *Piper aduncum* were (E)-nerolidol (19.30%) and trans-sabinene hydrate (18.79%), in the oil of *Piper hispidinervum* were safrole (73.44%) and p-mint-2,4(8)-diene (18.78%) and in the *Syzygium aromaticum* oil, eugenol (89.08%). The result of Minimum Inhibitory Concentration showed that all tested microorganisms showed sensibility to the oil of *S. aromaticum*. The oil of *P. hispidinervum* was more efficient for the fungi and the essential oil of *P. aduncum* showed the lower antimicrobial activity. In the data obtained *in vitro* and in antiseptics of the hands, the antiseptic with active principle of essential oil of *S. aromaticum* was effective against the microorganisms in different evaluated time periods.

Keywords: Antimicrobial activity. Antiseptic. Microorganism.

CAPÍTULO 1: Introdução geral

1 INTRODUÇÃO

As plantas aromáticas, condimentares e medicinais têm sido utilizadas por um público cada vez maior e vem recebendo incentivo da Organização Mundial de Saúde (OMS), que recomenda o desenvolvimento de pesquisas visando à utilização da flora. Esses elementos que antes se apresentavam, principalmente, como agentes vetores de aromas e gostos característicos aos alimentos, apresentam agora uma nova perspectiva de emprego.

Pesquisas evidenciam a potencialidade de constituintes vegetais como agentes antimicrobianos capazes de serem aproveitados como fonte de compostos alternativos, eficientes e viáveis, para o alcance do controle do crescimento e da sobrevivência de microrganismos nas várias áreas da microbiologia.

Os óleos essenciais apresentam atividade biológica e servem como uma fonte alternativa de agentes antimicrobianos contra patógenos causadores de doenças alimentares ou deteriorantes de alimentos. A higiene pessoal é uma das medidas mais importantes para prevenir as doenças transmitidas por alimentos. Além da tradicional lavagem com água e sabão, o uso de antissépticos tem se destacado, pois, são essenciais no processo de higienização pessoal, possuem boa atividade antimicrobiana, dispensam a pia e alguns ainda previnem o ressecamento de mãos.

Em estudos com óleos essenciais foi demonstrado que eles apresentam grande eficiência antimicrobiana, sendo muitos deles extraídos de condimentos ou especiarias que são habitualmente utilizados na preparação de alimentos, não apresentando toxicidade ao homem nas concentrações utilizadas. Devido a essa característica, tornam-se viáveis estudos que evidenciem o uso de produtos naturais como agentes antissépticos na prevenção de doenças.

Em face do exposto, este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar o potencial biocida dos óleos essenciais de *Piper hispidinervum*, *Piper aduncum* e *Syzygium aromaticum*, bem como o uso de óleos essenciais como principal princípio ativo na formulação de antisséptico e sua ação sob microrganismos patogênicos e deterioradores.

Sendo assim, no Capítulo 1, faz-se uma revisão sobre a importância dos manipuladores de alimentos e sua contribuição nos surtos de doenças transmitidas por alimentos, a importância da higiene pessoal e a potencialidade de compostos vegetais como agentes antimicrobianos capazes de serem aproveitados como fonte de eficientes e viáveis compostos alternativos para o alcance e o controle do crescimento e a sobrevivência de microrganismos as várias áreas da microbiologia. No Capítulo 2 realiza-se a caracterização química e o potencial biocida dos óleos essenciais de *Piper aduncum*, *Piper hispidinervum* e *Syzygium aromaticum* sobre microrganismos patogênicos e toxigênicos importantes para alimentos e, no Capítulo 3, apresenta-se o desenvolvimento e a avaliação de um antisséptico com princípio ativo de óleo essencial de *Syzygium aromaticum*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Manipulação higiênica de alimentos

Ao longo do processo de produção, elaboração, transporte, armazenamento e distribuição, qualquer alimento está sujeito à contaminação por substâncias tóxicas ou por bactérias patogênicas, fungos, vírus e parasitas. Portanto, a higienização e a segurança na produção de alimentos são questões de saúde pública (CATÃO; CEBALLOS, 2001).

Apesar da evolução dos conhecimentos sobre os microrganismos, dos mecanismos de intoxicações e das técnicas de higienização, tem-se observado, ainda, a ocorrência de um número elevado de surtos e de casos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) (ANDRADE, 2008).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), as doenças de origem alimentar representam um dos maiores problemas de saúde em todo o mundo. A contaminação dos alimentos pode ter várias origens, entretanto, o manipulador é uma das principais causas da maior incidência de surtos alimentares, pois seu estado de saúde e suas práticas higiênicas influenciam em cada operação realizada (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE - OMS, 1984).

Dados da OMS indicam que os manipuladores são responsáveis, direta ou indiretamente, por até 26% dos surtos de enfermidades bacterianas veiculadas por alimentos (FREITAS, 1990). O Ministério da Saúde, na RDC nº 12/2001, define DTA como uma síndrome originada pela ingestão de alimentos e ou de água que contenha agentes etiológicos (biológicos, toxinas, físicos ou substâncias químicas) em quantidades tais que afetem a saúde do consumidor de forma individual ou de um grupo de população (BRASIL, 2001).

As doenças transmitidas por alimentos são classificadas como: a) intoxicações causadas por ingestão do produto contendo venenos químicos ou toxinas produzidas por microrganismos; b) infecções mediadas por toxinas causadas por bactérias que produzem enterotoxinas (toxinas que afetam a água, glicose e transferência de eletrólitos), durante sua colonização e crescimento no trato intestinal e c) infecções causadas quando microrganismos invadem e multiplicam-se na mucosa intestinal ou em outros tecidos. Essas manifestações variam desde um desconforto leve até reações severas que podem terminar em morte (CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA - CVE, 2008).

No que concerne à indústria de alimentos, é interessante ressaltar que muitas contaminações são provenientes de procedimentos de limpeza inadequados e de comportamentos impróprios dos manipuladores de alimentos. As Boas Práticas de Fabricação (BPF) são um conjunto de regras que definem formas ideais de fabricação a partir de mudanças nos métodos de limpeza, comportamento das pessoas envolvidas, equipamentos e edifícios, buscando eliminar as fontes genéricas de possíveis contaminações de um produto (CARBALLIDO; VIYELLA; MORENO, 1994).

Segundo Duarte (2005), a ação específica do manipulador de alimentos é responsável pela redução, minimização ou eliminação dos perigos alimentares. E toda essa responsabilidade começa pela higiene pessoal, ambiental, dos equipamentos e da operação a ser realizada.

Portanto, as pessoas que manipulam alimentos têm uma função importante na preservação da higiene, pois podem representar importante fonte de transmissão de patógenos. Uma das formas de se prevenir a propagação de doenças veiculadas pelos alimentos é a higiene correta das mãos.

2.1.1 Higiene das mãos

A microbiota das mãos e do vestuário externo dos manipuladores de alimentos normalmente reflete o meio e os hábitos individuais. Os organismos envolvidos podem ser os do solo, das águas, do pó e de outras fontes do meio. Fontes importantes de contaminação são, ainda, as cavidades nasais, a pele e o trato gastrointestinal, os quais podem ser fontes de microrganismos devido a práticas higiênicas precárias (JAY, 2005).

As mãos podem ser uma via de contaminação de vários microrganismos patogênicos, como os coliformes fecais, *Escherichia coli*, os quais são indicadores de contaminação fecal; *Staphylococcus aureus*, que indicam a presença de material nasal ou orofaríngeo; *Bacillus cereus*, indicador de contaminação ambiental e *Pseudomonas aeruginosa*, indicativo de que houve utilização inadequada de produtos antissépticos (FERREIRA, 2005).

Segundo Lagaggio, Flores e Segabinazi (2002), os principais microrganismos patogênicos encontrados em alimentos e nas mãos de seus manipuladores consistem de coliformes fecais. Entre eles citam-se *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Dessa forma, a higiene das mãos torna-se imprescindível, uma vez que ela tem a finalidade de remover sujidades, suor, oleosidade, pelos, células descamativas e da microbiota da pele, de forma a prevenir ou a interromper a transmissão de infecções veiculadas pelo contato ou pela contaminação cruzada (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA, 2007).

A eliminação de todos os microrganismos das mãos é impossível, mas a eficiência da lavagem pode ser melhorada pela aplicação de antisséptico após seu término.

2.2 Agentes antissépticos

O aumento das preocupações com o potencial de contaminação microbiana e com os riscos de contaminação e infecção alimentar ocasionou um aumento do uso de desinfetantes e de antissépticos por parte do público em geral (MCDONELL; RUSSELL, 1999).

Os agentes antissépticos são substâncias aplicadas à pele para reduzir o número de agentes da microbiota transitória e residente, e os desinfetantes são produtos que matam todos os microrganismos patogênicos, mas não necessariamente todas as formas microbianas esporuladas em objetos e superfícies inanimadas (ANVISA, 2007).

Na pele das mãos podem ser encontradas, principalmente, duas populações de microrganismos: os pertencentes à microbiota residente e à microbiota transitória. A microbiota residente é constituída por microrganismos de baixa virulência, como *Staphylococcus*, *Corynebacterium* e *Micrococcus*, pouco associados às infecções veiculadas pelas mãos. É mais difícil de ser removida pela higienização das mãos com água e sabão, uma vez que coloniza as camadas mais internas da pele (ANVISA, 2007).

A microbiota transitória coloniza a camada mais superficial da pele, o que permite sua remoção mecânica pela higienização das mãos com água e sabão, sendo eliminada com mais facilidade quando se utiliza uma solução antisséptica. É representada, tipicamente, pelas bactérias gram-negativas, como enterobactérias (Ex: *Escherichia coli*) e bactérias não fermentadoras (Ex: *Pseudomonas aeruginosa*), além de fungos e vírus (ANVISA, 2007).

Os antissépticos devem remover ou destruir os microrganismos presentes na pele sem alterar as estruturas. Terapeuticamente falando, o papel dos antissépticos é o de auxiliar os meios naturais de defesa da pele no controle

de microrganismos patogênicos responsáveis por infecções cutâneas. O espectro de ação, o tempo de início de ativação, o tempo de atividade, os efeitos residuais, a toxicidade, a capacidade de penetração e as possíveis substâncias que inativam os antissépticos podem variar de um produto para outro (SÁNCHEZ-SALDAÑA; ANDUAGA, 2005).

Entre os principais antissépticos utilizados para a higienização das mãos destacam-se álcoois, clorexidina, compostos de iodo, iodóforos e Triclosan (ANVISA, 2007; KAWAGOE, 2004). Tais antissépticos são testados em espécies bacterianas envolvidas em DTAs, como *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. e *Staphylococcus aureus*.

Em geral, o mecanismo de ação dos antissépticos e desinfetantes depende de três mecanismos básicos, incluindo capacidade de coagular e precipitar proteínas, alterar as características de permeabilidade celular e toxicidade ou envenenamento dos sistemas enzimáticos das bactérias. Estes podem produzir a morte ou a inibição celular das bactérias por oxidação, hidrólise ou inativação de enzimas, com perda de constituintes celulares (SÁNCHEZ-SALDAÑA; ANDUAGA, 2005).

2.3 Microrganismos envolvidos em surtos de intoxicação alimentar

As bactérias, os fungos, os vírus, os parasitas, os agentes químicos e as substâncias tóxicas de origens animal e vegetal atuam como agentes etiológicos de surtos de intoxicação alimentar, mas não há dúvidas da importância das bactérias como agentes das doenças de origem alimentar (ANDRADE; SILVA; BRABES, 2003). De acordo com o Center For Disease Control nos EUA, elas são responsáveis pela ocorrência de cerca de 70% dos surtos e 95% dos casos de toxinfecções alimentares (BUZBY et al., 1996).

A maioria dos casos de toxinfecção alimentar no homem é atribuída à *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus* e *Clostridium perfringens*. Sabe-se, contudo, que uma porção substancial dos casos é determinada por espécies não rotineiramente avaliadas durante a investigação de surtos (BULHÕES; ROSSI JÚNIOR, 2002).

2.3.1 *Aeromonas hydrophila*

Aeromonas hydrophila são bastonetes gram-negativos de vida livre, anaeróbios facultativos, pertencentes provisoriamente à família Vibrionaceae. Foi proposto, recentemente, que esta espécie fosse classificada numa nova família, Aeromonadaceae (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004).

Aeromonas hydrophila está presente em ambientes de água fresca e em águas salgadas. Tem sido frequentemente encontrada em peixes e frutos do mar e em amostras de carne vermelha (gado, porco e ovelha) e de frango de mercado. Algumas linhagens de *A. hydrophila* são capazes de causar doenças em peixes e anfíbios, bem como em humanos, os quais adquirem infecções por meio de feridas abertas ou pela ingestão de alimentos e água contaminada (FORSYTHE, 2005).

Aeromonas têm emergido como importante patógeno humano, devido à suspeita de estarem relacionadas com surtos provocados por alimentos e pelo aumento da incidência de isolamento de *Aeromonas* de pacientes com diarreia (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004). Esse microrganismo pode ocasionar diversas infecções, incluindo gastroenterites em indivíduos saudáveis ou até septicemia em indivíduos com o sistema imunológico debilitado (FORSYTHE, 2005).

2.3.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli é uma bactéria gram-negativa, anaeróbica facultativa e um dos habitantes mais comuns do trato intestinal. Sua presença na água e nos alimentos é um importante indicador de contaminação fecal, porém, não é normalmente considerada patogênica; entretanto, pode ser a responsável por infecções urinárias e produtora de enterotoxinas, que podem causar graves doenças de origem alimentar (TORTORA, 2005).

A bactéria *Escherichia coli* é parte da flora normal do colo em humanos e outros animais, mas pode ser patogênica dentro ou fora do trato gastrintestinal (HARVEY; CHAMPE; FISHER, 2008). No trato intestinal dos animais (incluindo o homem) exerce um efeito benéfico sobre o organismo, suprimindo a multiplicação de bactérias prejudiciais e sintetizando uma considerável quantidade de vitaminas. Dentre as cepas de *E.coli*, entretanto, há um grupo capaz de provocar doenças em indivíduos humanos, coletivamente chamadas de *E.coli* enteropatogênicas (EEC) (OLSEN et al., 2000).

Atualmente, há seis classes de *E.coli* enteropatogênicas reconhecidas. Dentre elas, as mais importantes para alimentos é *E.coli* O157:H7, que pertence ao grupo das *E.coli* entero-hemorrágicas (EHEC) ou produtoras de verotoxina (VTEC) (SILVA et al., 2003).

2.3.3 *Listeria monocytogenes*

As espécies de *Listeria* são bacilos delgados e curtos gram-positivos que não formam esporos. São parasitas intracelulares ávidos que podem ser vistos dentro das células do hospedeiro em amostras de tecido (HARVEY; CHAMPE;

FISHER, 2008). São capazes de crescer em temperatura de geladeira, embora sua temperatura ideal seja 37°C (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004).

Listeria spp. é um microrganismo que se encontra amplamente disseminado na natureza, podendo ser encontrada no solo, na água, nos alimentos e como microbiota normal do homem e animais (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004). Todas as espécies de *Listeria* são encontradas na natureza e podem, eventualmente, contaminar os alimentos, porém, somente a *Listeria monocytogenes* é patogênica para o homem (CARTER et al., 1995), tornando-se um dos principais patógenos nas doenças transmitidas pelos alimentos (TAEGER, 1999).

As infecções por *Listeria* que podem ocorrer como casos esporádicos ou em pequenas epidemias, geralmente são veiculadas por alimentos como laticínios processados (incluindo sorvete e queijo), carne moída e carne de aves vendidas em atacado (HARVEY; CHAMPE; FISHER, 2008).

Órgãos de saúde e indústrias alimentícias aumentaram o interesse sobre *L. monocytogenes* devido a diversos fatores, entre eles, a resistência a condições adversas (calor, elevada concentração de sais, baixas temperaturas), a gravidade da patologia e à incidência de listeriose veiculada por alimentos (BLACKMAN; FRANK, 1996). A prevenção das infecções por *L. monocytogenes* pode ser obtida pelo preparo e manuseio apropriado dos alimentos (HARVEY; CHAMPE; FISHER, 2008).

2.3.4 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa pertence à família Pseudomonadaceae. Trata-se de bacilos gram-negativos retos, não esporulados, móvel por um simples flagelo polar e aeróbios obrigatórios e são capazes de crescer rapidamente em

meios muito simples. Alteram muitos alimentos ricos em proteínas, como leite, ovos, carne e alimentos marinhos, como peixes e camarão, além de vegetais (MASSAGUER, 2005). Esta espécie é comumente encontrada no solo, na água, nos vegetais, nos alimentos, nos animais e nos mais diversos ambientes hospitalares (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004).

Esse microrganismo permanece como um dos mais prevalentes agentes de infecções hospitalares em todo o mundo (ARRUDA, 1998). Sua importância clínica está baseada na difícil erradicação da infecção e contínuos fracassos terapêuticos, consequência direta da ampla expressão de fatores de virulência, assim como resistência natural e adquirida a muitos antibióticos e desinfetantes (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004).

P. aeruginosa tem recebido atenção pela frequência com que está relacionada a doenças em pacientes com comprometimento imunológico, acompanhado de procedimentos invasivos, queimaduras e feridas operatórias, que se tornam porta de entrada para esta espécie (OLIVEIRA; ALBUQUERQUE; ROCHA, 1998).

2.3.5 *Salmonella typhi*

Salmonella sp. é amplamente distribuída na natureza. O sorotipo Typhi é o único patógeno exclusivamente humano, enquanto as outras linhagens são associadas a animais e a alimentos, como, por exemplo, ovos e frangos (HARVEY; CHAMPE; FISHER, 2008).

Salmonella enterica sorovar *Typhi*, bactéria gram-negativa da família *Enterobacteriaceae*, é o agente etiológico da febre tifoide. É responsável por 22 milhões de novos casos por ano no mundo, 5% dos quais são fatais (CRUMP; LUBY; MINTZ, 2004; IVANOFF, 2003).

A transmissão da enfermidade se dá pela ingestão de água ou de alimentos contaminados com fezes humanas ou, menos frequentemente, com urina contendo a bactéria; mais raramente pode ser transmitida pelo contato direto (mão/boca) com fezes, urina, secreção respiratória, vômito ou pus proveniente de indivíduo infectado (BASTOS et al., 2008). A contaminação de alimentos geralmente acontece pela manipulação por portadores, razão pela qual a febre tifoide é também conhecida como a doença das mãos sujas (BRASIL, 2005).

A doença se caracteriza clinicamente por febre, cefaleia, diarreia e/ou constipação, dor abdominal, podendo causar ainda danos respiratórios, hepáticos, esplênicos e neurológicos. A emergência da resistência bacteriana aos antibióticos disponíveis pode ainda ser um fator agravante dessa salmonelose, já que o tratamento de indivíduos com febre tifoide consiste, basicamente, em antibióticos e reidratação (BASTOS et al., 2008).

Os principais alimentos responsáveis pela transmissão da febre tifoide são ostras e outros moluscos, assim como leite e derivados, mas praticamente todos os alimentos, quando manipulados por portadores, podem veicular a *Salmonella typhi* (BRASIL, 2005).

2.3.6 *Staphylococcus aureus*

As bactérias do gênero *Staphylococcus* pertencem à família *Micrococcaceae* e apresentam-se como cocos Gram-positivos, com diâmetro entre 0,5 a 1,5 µm, imóveis, agrupados em massas irregulares ou em cachos de uva. São aeróbios ou aeróbios facultativos, produtores de catalase e, normalmente, beta-hemolíticos. Fermentam a glicose com produção de ácido, tanto em aerobiose como em anaerobiose (TORTORA, 2005).

Staphylococcus aureus é um importante patógeno devido à sua virulência, resistência aos antimicrobianos e associação a várias doenças, incluindo enfermidades sistêmicas potencialmente fatais, infecções cutâneas, infecções oportunistas e intoxicação alimentar (LOWY, 1998). A intoxicação alimentar causada por esta bactéria está relacionada à contaminação de alimentos pelas enterotoxinas termoestáveis por ela produzidas que podem permanecer no alimento, mesmo após o cozimento (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

Esta bactéria habita com frequência a nasofaringe do ser humano, a partir da qual pode facilmente contaminar as mãos do homem e penetrar no alimento, causando a intoxicação alimentar estafilocócica (KENNEDY et al., 2000). Ele também é uma causa frequente de infecções cutâneas nas mãos podendo ser disseminada aos alimentos através de ferimentos (TORTORA, 2005).

Entre os principais substratos alimentícios capazes de suportar o desenvolvimento natural do *Staphylococcus aureus* podem ser citados os produtos lácteos, como queijo, leite cru ou pasteurizado e manteiga, além de sorvetes, produtos de confeitaria, como bolos recheados, tortas e doces cremosos, carnes frescas e curadas, ovos e massas alimentícias (SANTOS, 2004).

2.4 Contaminação microbiológica por fungos filamentosos e leveduras

A contaminação e a deterioração dos alimentos causados por fungos são mais comuns que as originadas por qualquer outro grupo de microrganismos. A contaminação por fungos é importante não apenas do ponto de vista sensorial,

mas também pelo perigo que a produção de micotoxinas representa para o consumidor (MUNINBAZI; BULLERMAN, 1996).

As micotoxinas são metabólitos secundários de fungos filamentosos, tóxicos ao homem e animais, mesmo em baixas concentrações, e são produzidas por espécies pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Alternaria*, *Claviceps*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Strobilomyces*. São fungos que, geralmente, contaminam os produtos agrícolas tanto na pré e na pós-colheita. Quando ingeridas, as micotoxinas podem resultar em doenças crônicas ou agudas. As doenças crônicas apresentam um impacto maior, induzindo e iniciando diversos efeitos tóxicos, como carcinogênico, mutagênico, teratogênico, estrogênico, hemorrágicos, imunossupressivos, nefrotóxicos, hepatóxicos, dermatóxicos e neurotóxicos (MILICEVIC; SKRINJAR; BALTIC, 2010).

2.4.1 *Aspergillus flavus*

Aspergillus flavus é uma espécie de fungo que pode ser encontrado em diversos alimentos, como nozes, temperos, sementes oleaginosas, cereais e, ocasionalmente, em frutas secas. Esse fungo parece passar a maior parte de sua vida como um saprófita no solo, onde desempenha um papel importante como reciclador de nutrientes. Essa espécie também é capaz de causar doenças em culturas economicamente importantes, tais como milho e amendoim. Ele é capaz de produzir micotoxinas potentes, como as aflatoxinas B₁ e B₂ e é considerado o segundo maior causador de aspergilose invasiva e não invasiva (HEDAYATI et al., 2007).

2.4.2 *Aspergillus fumigatus*

Aspergillus fumigatus pode ser encontrado em cereais aquecidos, na compostagem e no lixo (SAMSON; HOEKSTRA; FRISVAD, 2000). Ecologicamente, esta espécie é comumente encontrada em países com clima temperado. Devido à sua patogenicidade, os isolados devem ser manuseados com cuidado. *A. fumigatus* é o agente etiológico mais comum da aspergilose pulmonar, sendo responsável por aproximadamente 90% de todos os casos de infecções fúngicas (LUCCA, 2007).

2.4.3 *Aspergillus niger*

A. niger pode ser encontrado em vários alimentos, principalmente em alimentos secos e especiarias. Esta é uma espécie amplamente utilizada em processos biotecnológicos e a única que possui o “status” (“Generally Regarded as Safe”) pela Food And Drug Administration. No entanto, algumas espécies destacam-se pela produção de micotoxinas. A principal micotoxina relacionada a estas espécies é a ocratoxina A (OTA), que vem merecendo atenção mundial pelo risco que pode causar à saúde de animais e humanos (ABARCA et al., 2004; BENNETT; KLICH, 2003). As ocratoxinas são potencialmente nefrotóxicas e carcinogênicas, teratogênicas e imunotóxicas (FORSYTHE, 2005).

2.4.4 *Aspergillus parasiticus*

Aspergillus parasiticus é uma espécie de fungo comum em cereais, no solo e, principalmente, no amendoim. Ele pertence à Seção Flavi e possuem

conídios em tons verde-amarelados e escleródios marrons (KLICH, 2002). *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* são as principais espécies produtoras de aflatoxinas desta Seção (CODNER; SARGEANT; YEO, 1963; SCHROEDER, 1966; PITT; HOCKING, 1997; VARGA et al., 2003). O *Aspergillus parasiticus*, quando se desenvolve, pode produzir as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ (PITT; HOCKING, 1997).

2.4.5 *Candida albicans*

A levedura *Candida albicans* faz parte da flora normal da boca, do trato gastrointestinal e da vagina. Sua multiplicação, normalmente, é inibida por outros microrganismos da flora normal e pelos mecanismos de defesa do organismo. Uma diminuição desses mecanismos, que ocorre em algumas doenças debilitantes, pode gerar condições para um crescimento descontrolado da levedura (PELCZAR JÚNIOR; CHAN; KRIEG, 1996).

A distribuição das leveduras do gênero *Candida* é muito ampla no meio ambiente, fazendo parte da microbiota normal ou participando de alguma patologia. *C. albicans* só ocorre no solo e na água quando os mesmos são contaminados por dejetos humanos e animais (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004).

2.4.6 *Cladosporium cladosporioides*

Cladosporium cladosporioides é uma espécie muito comum e que apresenta uma ampla distribuição, podendo ocorrer em materiais vegetais ou no solo. Esta espécie também pode ser isolada do ar, de produtos têxteis, de sementes e de diversos tipos de culturas. Ele provoca podridão em frutas,

legumes e outros produtos agrícolas, especialmente após a colheita (LUCCA, 2007). *Cladosporium cladosporioides* é comum também em ambientes fechados (SAMSON; HOEKSTRA; FRISVAD, 2000).

2.4.7 *Penicillium brevicompactum*

Penicillium brevicompactum foi isolado a partir de uma ampla gama de alimentos, incluindo queijos, presuntos, salsichas italianas, alimentos secos, produtos de panificação, grãos de cereais e água de torneira. Esta espécie é capaz de produzir o ácido micofenólico (MPA), que está cada vez mais associado aos casos de fibrose pulmonar e processos alérgicos e é muito comum em ambientes fechados (NDAGIJIMANA et al., 2008).

2.4.8 *Penicillium citrinum*

Penicillium citrinum é comum em vários tipos de alimentos e no setor de cereais tropicais e especiarias. Esta espécie também pode ocorrer em ambientes fechados. Um metabólito secundário produzido por esta espécie de *Penicillium* é a citrinina, que pode ser encontrada na cultura do milho (PITT; HOCKING, 1997). A citrinina foi associada à síndrome do arroz-amarelo, no Japão, em 1971, em virtude da constante presença de *P. citrinum* nesse tipo de alimento (SAITO; ENOMOTO; TATSUNO, 1971).

2.4.9 *Penicillium solitum*

Penicillium solitum é contaminante de diversos produtos alimentícios como queijos, patê de fígado, peixe seco e produtos de carne. Esta espécie é

comum no ar e pode ser patógeno de maçãs e peras, principalmente durante o armazenamento destes frutos (PITT; HOCKING, 1997).

O controle dos fungos filamentosos nas lavouras é feito por meio do uso de fungicidas. Já na indústria de alimentos, a prevenção da contaminação é realizada dentro da higienização com o uso de desinfetantes. A presença dos fungos filamentosos normalmente estará associada com deterioração dos alimentos.

2.5 Plantas aromáticas, condimentares e medicinais

Plantas aromáticas são aquelas que têm aroma capaz de sensibilizar nosso olfato de modo agradável. Plantas condimentares são utilizadas como tempero, para realçar o sabor e o aspecto dos alimentos, podendo apresentar propriedade de conservação, enquanto as medicinais possuem princípio ativo que, dependendo da concentração, podem possuir propriedades tóxicas ou curativas (UPNMOOR, 2003). Existem plantas que podem ser, ao mesmo tempo, aromáticas, condimentares e medicinais, e sua utilização é relevante desde as primeiras civilizações (FURLAN, 1998).

Determinadas especiarias foram empregadas para embalsamar no antigo Egito; em muitos países, são utilizadas para fins medicinais e, em locais de clima quente onde falta refrigeração, têm servido para mascarar o sabor e o odor de carne em início de decomposição (BEDIN; GUTKOSKI; WIEST, 1999). No Brasil, o emprego de plantas medicinais está presente desde antes da colonização, quando os índios já utilizavam ervas, passando pelos colonizadores e, hoje, é amplamente empregada na medicina caseira nas formas de chás, xaropes, entre outros (RATES, 2001).

Diversas plantas encontradas nos biomas brasileiros, tais como a mata atlântica, floresta amazônica e cerrado, têm sido empregadas como fármacos naturais pelas populações locais no tratamento de várias doenças tropicais, incluindo esquistosomose, leishmaniose, malária e infecções fúngicas e bacterianas (ALVES et al., 2000).

A grande maioria dessas plantas é de ervas ou arbustos de consistência herbácea que vegetam pelos campos ou sub-bosques das matas. Umam adaptam-se mais à terra firme, outras, nas várzeas; umas são consideradas invasoras de áreas cultivadas, outras aparecem nas frestas dos muros da cidade (SANTIAGO et al., 2001). Apresentam diversas vias metabólicas secundárias que levam à formação de compostos, cuja distribuição é restrita a algumas famílias, gêneros ou, mesmo, espécies. O conjunto de compostos secundários nas plantas é resultado do balanço entre a formação e a eliminação desses compostos durante o crescimento da planta, sendo esse equilíbrio influenciado por fatores genéticos e ambientais como a presença de luz, temperatura, tipo de solo e água, os quais são variáveis (CARDOSO et al., 2000).

Os compostos químicos formados e degradados são chamados de metabólitos e as reações enzimáticas envolvidas, respectivamente, são designadas como anabólicas, catabólicas ou de biotransformação. Essas reações visam, primariamente, ao aproveitamento de nutrientes para satisfazer às exigências fundamentais da célula (SANTOS et al., 2004).

Os óleos essenciais presentes nestas plantas servem como uma fonte alternativa de agentes antimicrobianos contra patógenos causadores de doenças alimentares ou deteriorantes de alimentos, sendo esses causadores de diversos prejuízos para as indústrias alimentícias. Recentemente, é crescente o interesse, por parte dos consumidores, por produtos naturais em decorrência de os

antimicrobianos sintéticos apresentarem toxicidade ao consumidor (KOTZEKIDO; GIANNAKIDIS; BOULMATIS, 2007).

Essas plantas têm demonstrando atividade biocida contra bactérias, fungos filamentosos e leveduras e suas principais características devem-se, principalmente, aos óleos essenciais (SARTORATTO et al., 2004; ARAÚJO, 2005; SCHWAN-ESTRADA et al., 2000).

2.5.1 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são produtos voláteis do metabolismo secundário de plantas aromáticas, normalmente formados em células especiais ou grupos de células encontrados em muitas folhas e caules de plantas. Eles são comumente concentrados em uma região em particular na planta e, quando ocorrem em vários órgãos em uma mesma planta, possuem diferentes perfis de composição (OUSSALAH et al., 2007).

São produzidos por meio do ciclo biossintético dos metabólitos secundários das plantas (Figura 1), variando a intensidade e a composição de acordo com a espécie, fatores ambientais e o estágio de desenvolvimento da planta (SIMÕES et al., 2007).

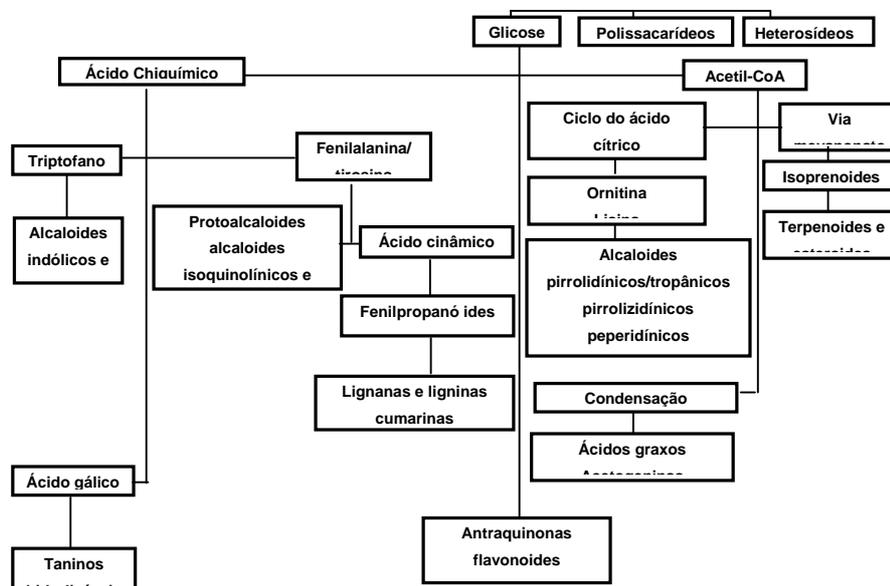


Figura 1 Ciclo biossintético dos metabólitos secundários

Fonte: SIMÕES et al., 2007.

Dependendo da família, podem ocorrer em estruturas secretoras especializadas, tais como pelos glandulares (Lamiaceae), células parenquimáticas diferenciadas (Lauraceae, Piperaceae e Poaceae), canais oleíferos (Apiaceae) ou em bolsas lisígenas ou esquizolisígenas (Pinaceae, Rutaceae). Podem ser estocados em certos órgãos, tais como nas flores, folhas, cascas, madeira, raízes, rizomas, frutos ou sementes (SIMÕES et al., 2007).

São misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Também podem ser chamados de óleos essenciais, óleos etéreos ou essências (SANTOS, 2004). Segundo Burt (2004), são líquidos oleosos aromáticos obtidos de materiais vegetais, como folhas, flores, brotos, sementes, cascas, ramos, madeira, frutas e raízes.

São, geralmente, incolores ou ligeiramente amarelados; poucos são os óleos que apresentam cor, como o óleo volátil de camomila, de coloração

azulada, pelo seu alto teor em azulenos; em geral, são muito instáveis, principalmente na presença de ar, luz, calor, umidade e metais; a maioria dos óleos voláteis tem índice de refração e é opticamente ativa, propriedades essas utilizadas na sua identificação e controle da qualidade (SIMÕES et al., 2007).

Os componentes químicos destes óleos são representados por várias misturas de terpenoides, especificamente monoterpenos (C10) e sesquiterpenos (C15), embora alguns diterpenos possam estar presentes (C20) (DORMAN; DEANS, 2000). Outros compostos também fazem parte como álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas e cumarinas, até compostos com enxofre (SIMÕES et al., 2007).

Para a extração dos óleos essenciais, podem ser aplicadas diversas técnicas, como hidrodestilação, prensagem, maceração, extração por solvente, enflouragem, gases supercríticos e micro-ondas. Dentre esses, o método de maior aplicação é o de hidrodestilação (SANTOS et al., 2004; BURT, 2004).

Avalia-se a produção brasileira de óleos essenciais em 45 milhões de dólares, o que corresponde a 13,1% da produção mundial. O maior empecilho ao desenvolvimento da agroindústria produtora de óleos essenciais é a concorrência com similares sintéticos (DI STASI, 1995).

2.5.2 Aspectos relacionados ao mecanismo de ação antimicrobiana de óleos essenciais

Os princípios ativos dos condimentos estão inseridos na classe dos preservativos de ocorrência natural nos alimentos, aparecendo como biomoléculas orgânicas de baixo peso molecular. Esses componentes têm sua inclusão em alimentos permitida pelas autoridades reguladoras (BRUL; COOTE, 1999).

O mecanismo de ação desses compostos sobre os microrganismos está relacionado à hidrofobicidade, que permite quebrar os lipídeos da membrana celular e da mitocôndria, alterando as estruturas e tornando-as mais permeáveis, acarretando em vazamento de íons e outros conteúdos celulares (CARSON; MEE; RILEY, 2002; BURT, 2004), além da inativação das enzimas extracelulares e diminuição de ATP intracelular (DELAQUIS; MAZZA, 1995). Em estudos desenvolvidos por Conner e Beuchat (1984) foi demonstrado que os óleos essenciais danificam vários sistemas enzimáticos, inclusive os envolvidos na produção de energia celular e na síntese de compostos estruturais, interferindo no mecanismo de reparo necessário para a divisão celular.

Considerando o grande número de diferentes grupos de compostos químicos presentes nos óleos essenciais, observa-se que sua atividade antibacteriana não é atribuída somente a um mecanismo específico, havendo vários diferentes alvos na célula microbiana (CARSON; MEE; RILEY, 2002). Barbel e Yashphe (1989), avaliando o efeito do óleo essencial de *Achillea fragmentissima* em *Escherichia coli*, concluíram que o óleo atua na membrana bacteriana, inibindo a respiração celular, reduzindo o conteúdo de ATP, além de facilitar a liberação de polipeptídeos e íons K^+ para o meio.

Os organismos vegetais possuem peptídeos ou proteínas, denominadas defensivas, que têm a capacidade de perturbar o funcionamento da membrana plasmática dos microrganismos (SEGURA et al., 1999). A ação inibitória de muitos desses peptídeos e proteínas está ligada à ruptura de membrana (CAMMUE et al., 1995). Os óleos essenciais são capazes de agir atuando, principalmente, nas proteínas de membrana, ocasionando a liberação do conteúdo celular (LAMBERT et al., 2001). A desestruturação da parede celular das bactérias é a principal ação de muitos antibióticos comerciais comumente produzidos pela indústria farmacêutica (BRUL; COOTE, 1999).

Com a ocorrência de uma alteração da parede celular do microrganismo, este se torna carente de uma estrutura que não aparece somente como uma cobertura inerte, mas sim como uma estrutura cumpridora de um papel dinâmico em todos os aspectos da fisiologia microbiana. Dessa forma, a célula microbiana torna-se carente de uma estrutura que age como uma barreira protetora, impedindo uma ruptura osmótica e capaz de conferir-lhe forma, sendo, assim, essencial para o seu desenvolvimento e viabilidade (YUNES et al., 2001).

Nas membranas dos fungos está presente o ergosterol, que se apresenta como modulador de fluidez da membrana fúngica. Quimicamente, classifica-se como um esteroide de membrana e qualquer ação sobre esse elemento desencadeia um desequilíbrio na fluidez da membrana plasmática dos fungos, vindo causar alterações na homeostase intracelular (SOUZA et al., 2003).

De forma geral, qualquer ação que interfira na composição da membrana plasmática celular microbiana estará tornando-a desprovida de uma organela essencial ao equilíbrio homeostático, condição fundamental para o seu ótimo funcionamento fisiológico. Assim, uma alteração nessa estrutura celular pode vir a tornar o ambiente microbiano intracelular incompatível com a sua sobrevivência (SOUZA et al., 2003).

As diferenças com respeito às técnicas empregadas para investigação da ação de compostos de plantas e uma grande variação encontrada na composição química de algumas preparações vegetais podem resultar em dados de difícil comparação entre as pesquisas (SIVROUPOULOU et al., 1995).

2.6 Espécie *Piper aduncum* (pimenta-de-macaco)

A espécie *Piper aduncum* L. (Figura 2), conhecida vulgarmente como pimenta-de-macaco, pertence à família Piperaceae e ocorre naturalmente na

Amazônia e no sudeste do Brasil (MOTA, et al., 2001; LUSTOSA; OLIVEIRA; ROMEIRO, 2007).

É um arbusto ou árvoreta de 2 a 7 m de altura, bastante nodoso, com espigas alongadas com 7 a 14 cm de comprimento e 2,5 a 3,5 mm de diâmetro, com flores minúsculas e frutos obpiramidais (SILVA, 2004). Possui folhas elípticas ou lanceoladas, com base redonda ou cardulata, ásperas na face ventral e pubescentes nas faces dorsal e ventral (PIMENTEL; PEREIRA; OLIVEIRA, 1998).



(A)

(B)

Figura 2 Aspecto de *Piper aduncum*, sendo (A) inflorescência (B) folhas frescas.

Segundo Fazolin (2005), os constituintes químicos mais comuns do gênero *Piper* são as amidas, destacando-se as isobutilamidas, a piperidina e a pirrolidina. Outro grupo de compostos potencialmente ativos e não menos importantes, que estão presentes em proporções consideráveis, é o dos fenilpropanoides, incluindo-se entre eles os monolignoides, como apiol, miristicina, eugenol, safrol, dímeros de fenilpropanoides e dilapiol.

Os constituintes químicos da composição do óleo essencial da espécie *Piper aduncum* L. são cânfora, monoterpenos, sesquiterpenos e dilapiol (GOTTLIEB et al., 1981). O dilapiol (Figura 3) aparece como constituinte principal no óleo essencial desta espécie, variando de 58% a 88,4% (SMITH; KASSIM 1979; GOTTLIEB et al., 1981). Segundo Pimentel, Pereira e Oliveira

(1998), o óleo essencial desta espécie constitui, predominantemente, de 12,71% a 28,73% desse composto. O dilapiol é um éter fenílico que vem sendo testado com êxito como fungicida, moluscicida, acaricida, bactericida e larvicida, com a vantagem de ser um produto biodegradável (LOBATO et al., 2007).

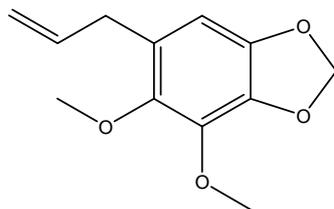


Figura 3 Estrutura química do dilapiol.

O óleo essencial da *Piper aduncum* tem um grande potencial de exploração, uma vez que possui comprovada ação sobre fitopatógenos de culturas tradicionais, como fungos (BASTOS, 2004; LOBATO et al., 2007), bactérias e moluscos (ORJALA et al., 1994), além de comprovada ação analgésica e anti-inflamatória, com baixos níveis de toxicidade (FONTES JÚNIOR et al., 2002). Suas espigas curvas e aromáticas contêm taninos, essências e resinas. A infusão das folhas é utilizada como estomáquica, balsâmica, adstringente e desobstruente do fígado (GUIMARÃES; GIORDANO, 2004). Dessa forma, tem grande potencial para exploração econômica, em função da comprovada utilidade de seu óleo essencial na agricultura e na saúde humana (MOTA et al., 2001).

2.7 Espécie *Piper hispidinervum* (pimenta-longa)

A *Piper hispidinervium* (Figura 4), vulgarmente conhecida como pimenta-longa, pertence à família das Piperaceas. É uma planta arbustiva, que ocorre naturalmente em áreas de capoeira no estado do Acre, principalmente no vale do rio Acre (THOMAZINI, 1999; OLIVEIRA; LUNZ, 1996).

Apresenta-se como um arbusto que se diferencia pelas características morfológicas de ramos pubescentes e folhas oblongo-lanceoladas ou oblongo-elípticas, levemente ásperas na face ventral (PIMENTEL; PEREIRA; OLIVEIRA, 1998). Suas inflorescências são espigas alongadas e curvadas, com 2-3 mm de diâmetro e comprimento acima de 10-12 cm, com flores minúsculas e frutos obpiramidais (YUNCKER, 1972).



(A)

(B)

Figura 4 Aspecto de *Piper hispidinervum*, sendo (A) inflorescência (B) folhas frescas.

Desenvolve-se, normalmente, em áreas de pousio (capoeiras), formando populações dominantes de grande densidade. Possui, em suas folhas, teores de safrol que variam de 90% a 94% em seu óleo essencial. Com base em coletas de espécies desse gênero, constatou-se que a pimenta-longa constitui uma espécie promissora para a produção de safrol (MAIA et al., 1987).

A grande vantagem de empregar a pimenta-longa como matéria-prima para a obtenção do safrol é que, sendo um recurso renovável, não agride o meio

ambiente, pois se exploram somente as folhas e os galhos finos, por meio de cortes pré-estabelecidos, sem a destruição da planta (THOMAZINI, 1999).

A descoberta de populações nativas de pimenta-longa no Acre, apresentando altos teores de safrol em seu óleo essencial, vem despertando interesse por parte das empresas processadoras que utilizam óleos ricos em safrol (SÁ; PIMENTEL, 2001), pois essa substância é utilizada como precursora na fabricação de inseticidas biodegradáveis, cosméticos e produtos farmacêuticos.

Os derivados mais importantes obtidos do safrol (Figura 5) são a heliotropina, ou piperonal, utilizada como componente de fragrâncias nas indústrias de cosméticos e perfumarias, e o butóxido de piperonila, utilizado como agente sinérgico, junto com o piretrium (OLIVEIRA; LUNZ, 1996).

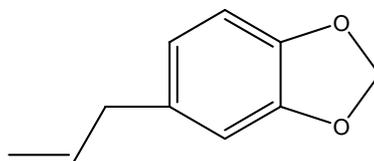


Figura 5 Estrutura química do safrol.

Em estudos de Miranda (2002), foi demonstrado que o safrol concentra-se nas folhas e ramos secundários da pimenta-longa, sendo extraído pelo processo de hidrodestilação. Este autor encontrou teor médio de umidade da matéria fresca em torno de 75%, sendo o rendimento de óleo da matéria seca de 3,5%, com teor de safrol superior a 92%.

O potencial econômico dessa pimenta a torna ideal para ser cultivada em pequenas propriedades, projetos de assentamento, reservas extrativistas e pólos

agroflorestais, pois essa espécie apresenta regeneração abundante e alta capacidade de rebrota após o corte. Estudos agrônômicos, fisiológicos, genéticos e agroindustriais estão em andamento na Embrapa Acre, para que a tecnologia de produção e processamento da cultura possa ser difundida aos produtores (THOMAZINI, 1999; MIRANDA, 2002).

2.8 Espécie *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia)

A árvore produtora de *Syzygium aromaticum* L. (Figura 6), vulgarmente conhecida como cravo-da-índia, da família Myrtaceae, é endêmica nas Molucas do Norte (Arquipélago de Molucas, Indonésia), tendo sido disseminada pelos alemães durante a colonização pelas outras ilhas do arquipélago, assim como para outros países. Atualmente, Zanzibar e Madagascar são os principais produtores desta espécie, seguidos pela Indonésia (MAZZAFERA, 2003).

No Brasil, praticamente apenas na Bahia, na região do Baixo Sul (Valença, Ituberá, Taperoá, Camamu e Nilo Peçanha), esta especiaria é produzida na forma comercial (FRAILE-FILHO et al., 2005).

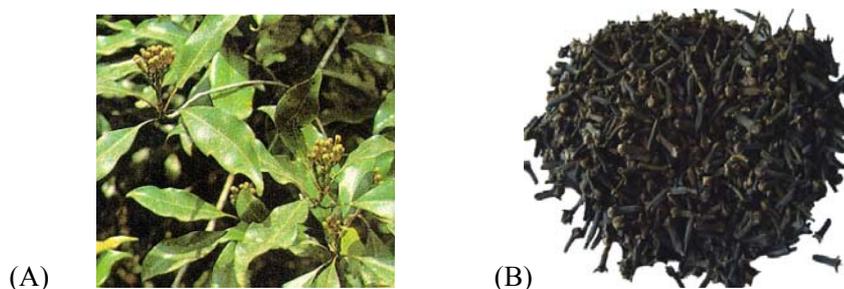


Figura 6 Aspecto de *Syzygium aromaticum*, sendo (A) folhas e flores e (B) botões florais secos.

Tem ampla utilização, atuando como estimulante estomacal, aromático e antisséptico, sendo empregado também como expectorante nas bronquites e como condimento versátil nas indústrias de perfumaria (SANTOS, 1988).

É muito utilizado também como condimento na culinária, devido ao seu marcante aroma e sabor, conferido por um composto fenólico volátil, o eugenol (Figura 7). Nas folhas, ele chega a representar aproximadamente 95% do óleo extraído (RAINA et al., 2001) e, nos botões florais, também é o principal componente do óleo, variando de 70% a 85% (BROWN; MORRA, 1995).

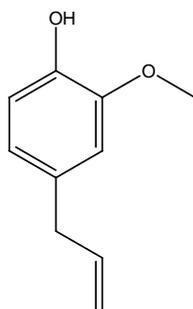


Figura 7 Estrutura química do eugenol.

Seu óleo essencial contém, além do eugenol, o acetato de eugenila e humuleno (SANTOS, 1988) e outros compostos, como ácido oleanólico, vanilina e ácido galotânico (ROOBERS et al., 1997).

O ácido oleanólico e o eugenol são substâncias que têm importantes atividades biológicas. O ácido oleanólico inibe as lipases, glicerol fosfatodesidrogenases, DNA-ligases e quinases AMP-c dependentes; tem atividade antiolesterolêmica, anti-hepatotóxica, antioxidante, anti-inflamatória, antifúngica, antibiótica e inibe o crescimento de tumores e de patógenos orais (LIU, 1995).

O eugenol, por sua vez, é amplamente utilizado em perfumaria, como aromatizante de alimentos e cigarros e como anestésico em tratamentos odontológicos. Possui também atividade antioxidante, hepatoprotetora e antinefrotóxica (KELECON et al., 2002).

Em alguns trabalhos foi demonstrado que eugenol, ou extratos de *S. aromaticum*, tem atividade bactericida (DORMAN; DEANS, 2000, NASCIMENTO et al., 2000), inseticida (EL-HAG; EL-NADI; ZAITOON, 1999), antiviral (YUKAWA et al., 1996) e fungicida (DELESPAUL et al., 2000) e é uma alternativa promissora no controle de ácaros fitófagos (GONÇALVES et al., 2001), podendo apresentar aplicabilidade na elaboração de antissépticos e desinfetantes.

REFERÊNCIAS

- ABARCA, M. L. et al. Taxonomy and significance of black aspergilli. **Antonie van Leuwnhoek**, New York, v. 86, n. 1, p. 33-49, July 2004.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Higienização das mãos em serviços de saúde**. Brasília, 2007. 52 p.
- ALVES, T. M. A. et al. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, n. 3, p. 367-373. maio/jun. 2000.
- ANDRADE, N. J. **Higienização na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo: Varela, 2008. 412p.
- ANDRADE, N. J.; SILVA, R. M. M.; BRABES, K. C. S. Avaliação das condições microbiológicas em unidades de alimentação e nutrição. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 3, p. 590-596, maio/jun. 2003.
- ARAÚJO, R. C. Z. **Embalagens ativas com ervas aromáticas e condimentares na conservação de pães artesanais**. 2005. 88 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.
- ARRUDA, E. A. G. Infecção hospitalar por *Pseudomonas aeruginosa* multi-resistente: análise epidemiológica no HC-FMUSP. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 31, p. 503-504, set./out. 1998.
- BARBEL, S.; YASHPHE, J. Effect of essential oil from *Achillea fragrantissima* on *Escherichia coli* cells. **Current Microbiology**, Oxford, v. 19, n. 6, p. 337-341, Dec. 1989.
- BASTOS, C. N.; ALBUQUERQUE, P. S. B. Efeito do óleo de *Piper aduncum* no controle em pós-colheita de *Colletotrichum musae* em banana. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 5, p. 555-557, set./out. 2004.

BASTOS, F. C. et al. Variabilidade genética de amostras de *Salmonella Typhi* isoladas de surto e de casos esporádicos ocorridos em Belém, Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 44, n. 4, p. 271-276, ago. 2008.

BEDIN, C.; GUTKOSKI, S. B.; WIEST, J. M. Atividade antimicrobiana das especiarias. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n. 65, p. 26-29, out. 1999.

BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**. Washington, v. 16, n. 3, p. 497-516, July, 2003.

BLACKMAN, I. C.; FRANK, J. F. Growth of *Listeria monocytogenes* as a biofilm on various food-processing surfaces. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 59, n. 8, p. 827-831, Aug. 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. 6. ed. Brasília, 2005. 816 p.

BROWN, P. D.; MORRA, M. J. Glucosinolate containing plant tissues as bioherbicides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 43, n. 12, p. 3070-3074, Dec. 1995.

BRUL, S.; COOTE, P. Preservatives agents in food: mode of action and microbial resistance mechanisms. **International Journal of food microbiological**, Amsterdam, v. 50, n. 1/2, p. 1-17, Sept. 1999.

BULHOES, C. C. C.; ROSSI JUNIOR, O. D. Ocorrência de bactérias do gênero aeromonas em queijo-de-minas frescal artesanal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 54, n. 3, p. 320-324, jun. 2002.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. **International Journal Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, n. 3, p. 223-253, Aug. 2004.

BUZBY, J. C. et al. **Bacterial foodborne disease: medical costs and productivity losses**. Washington: Economic Research Service, 1996. (Agricultural Economics Report, 741).

CAMMUE, B. P. A. et al. *Listeria*. In: ROBERTS, A. W.; CARTER. G. R.;

CHENGAPPA, M. M. **Essentials of veterinary microbiology**. 5. ed. Baltimore: Willians & Wilkins, 1995. p. 127-30.

CARBALLIDO, J. R.; VIYELLA, A. R.; MORENO, I. J. Exigencias de calidad en las empresas alimentarias: indústria carnica. **Alimentaria**, Lisboa, p. 23-26, jan./fev. 1994.

CARDOSO, M. das G. **Óleos essenciais**. Lavras: UFLA, 2000. 42p.

CARSON, C. F.; MEE, B. J.; RILEY, T. V. Mechanism of action of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil on Staphylococcus aureus determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 46, n. 6, p. 1914-1920, June 2002.

CARTER, G. R. et al. Listeria. In: ROBERTS, A. W.; CARTER, G. R.; CHENGAPPA, M. M. **Essentials of veterinary microbiology**. 5. ed. Baltimore: Willians & Wilkins, 1995. p. 127-30.

CATÃO, R. M. R.; CEBALLOS, B. S.O. *Listeria S.*, coliformes totais e fecais e *E.Coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios no Estado da Paraíba. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 3, p. 281-287, set./dez. 2001.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Manual de vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos – VEDTA**: sistema de informação e investigação de surtos. São Paulo, 2008.

CODNER, R. C.; SARGEANT, K.; YEO, R. Production of aflatoxin by the culture of strains of *Aspergillus flavus-oryzae* on sterilized peanuts. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 5, n. 3, p. 185-192, Feb. 1963.

CONNER, D. E.; BEUCHAT, L. R. Effects of essential oil from plants on growth of spoilage yeast. **Journal Food Science**, Chicago, v. 2, n. 49, p. 429-434. Mar./Apr. 1984.

CRUMP, J. A.; LUBY, S. A. P.; MINTZ, E. D. The global burden of typhoid fever. **Bull World Health Organ**, Atlanta, v. 82, n. 5, p. 346-353, May. 2004.

DELAQUIS, P. J.; MAZZA, G. Antimicrobial properties of isothiocyanate in food preservation. **Food Technology**, Chicago, v. 49, p.73-84, 1995.

DELESPAUL, Q. et al. The antifungal activity of essential oils as determined by different screening methods. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 12, p. 256-266, Mar. 2000.

DI STASI, L.C. **Plantas medicinais: arte e ciência**. São Paulo: Unesp, 1995. 230p.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 88, n. 2, p. 308-316, Feb. 2000.

DUARTE, T. M. D. **Higienização de manipuladores de alimentos**. 2005. 48 p. Monografia (Especialização em Nutrição Humana e Saúde) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

EL-HAG, E. A.; EL-NADI, A. H.; ZAITOON, A. A. Toxic and growth retarding effects of three plant extracts on *Culex pipiens* larvae (Diptera: Culicidae). **Phytotherapy Research**, London, v. 13, n. 5, p. 388-392. Aug. 1999.

FAZOLIN, M. et al. Toxicidade do óleo de *Piper aduncum* L. a adultos de *cerotoma tingomarianus* Bechyné (Coleoptera: Chrysomelidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 34, n. 3, p. 485-489, May/June 2005.

FERREIRA, U. L. **Considerações sobre a importância do manipulador de alimentos**. 2005. 41 p. Monografia (Especialização em Nutrição Humana e Saúde) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

FONTES JÚNIOR, E. A. et al. **Atividade antiinflamatória e analgésica do óleo essencial de *Piper aduncum***. In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 17., 2002, Salvador. **Anais...** Salvador: Mix Tecnologia Digital, 2002. p. 66.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 424.

FRAIFE-FILHO, G. A.; CÉSAR, J. O.; RAMOS, J. V. **Cravo-da-índia**. Itabuna: CEPLAC. 2005. (Radar Técnico). Disponível em: <<http://www.ceplac.gov.br/radar.htm>>. Acesso em: 10 out. 2009.

FRANCO, B. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. 182p.

FREITAS, M. A. Q.; MAGALHÃES, H. Enerotogenicidade de *Staphylococcus aureus* isolados de vacas com mastite. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 21, n. 4, p. 315-319, out./dez. 1990.

FURLAN, M. R. **Ervas e temperos: cultivo e comercialização**. Cuiabá: Sebrae, 1998. 128 p.

GONÇALVES, M. E. C. et al. Extratos aquosos de plantas e o comportamento do ácaro verde da mandioca. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 58, n. 3, p. 475-479, jul./set. 2001.

GOTTLIEB, O. R. et al. Óleos essenciais da Amazônia VII. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 11, n. 1, p. 143-148, jan. 1981.

GUIMARÃES, E. R.; GIORDANO, L. C. S. Piperaceae do nordeste brasileiro I: estado do Ceará. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 55, n. 84, p. 21-46, 2004.

HARVEY, R. A.; CHAMPE, P.C.; FISHER, B. D. **Microbiologia ilustrada**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 448p.

HEDAYATI, M. T. et al. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. **Microbiology**, Reading, v. 153, n. 6, p. 1677- 1692, June 2007.

IVANOFF, B. C. C. C. **The diagnosis, prevention, and treatment of typhoid fever**. Geneva: World Health Organization, 2003. 38p.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p.

KAWAGOE, J. Y. **Higiene das mãos: comparação da eficácia antimicrobiana do álcool - formulação gel e líquida - nas mãos com matéria orgânica**. 2004. 132p. Tese (Doutorado em Enfermagem na Saúde do Adulto) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

KELECOM, A. et al. Novas atividades biológicas em antigos metabólitos: ácido oleanólico e eugenol de *Eugenia caryophyllata*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Maringá, v. 12, n. 1, p.70-71, jan. 2002.

KENNEDY, M. et al. Use of ground beef model to assess the effect of the lactoperoxidase system on the growth of *Escherichia coli* O 157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in red meat. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 57, n. 3, p. 147-158, June 2000.

KLICH, M. A. **Identification of common *Aspergillus* species**. Amsterdam: Centraalbureau voor Schimmelauteurs, 2002. 116 p.

KOTZEKIDOU, P.; GIANNAKIDIS, P.; BOULMATIS, A. Antimicrobial activity of some plant extracts and essential oil against foodborn pathogens in vitro and on the fate of inoculated pathogens in chocolate. **Food Science and Technology**, London, v. 41, n. 1, p. 119-127, Jan. 2007.

LAGAGGIO, V. R. A.; FLORES, M. L.; SEGABINAZI, S. D. Avaliação microbiológica da superfície de mãos dos funcionários do restaurante universitário, da Universidade Federal de Santa Maria, RG. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 100, p. 107-110, set. 2002.

LAMBERT, R. J. W. et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, n. 3, p. 453-462, Sept. 2001.

LIU J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. **Journal of Ethnopharmacology**, Lousanne, v. 49, n. 2, p. 57-68, Dec. 1995.

LOBATO, A. K. S. et al. Ação do óleo essencial de *Piper aduncum* L. utilizado como fungicida natural no tratamento de sementes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 915-917, jul. 2007.

LOWY, F. D. *Staphylococcus aureus* infections. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 339, n. 8, p. 520-532, Feb. 1998.

LUCCA, A. J. Harmful fungi in both Agriculture and Medicine. **Revista Iberoamericana Micologia**, Bilbao, v. 24, n. 1, p. 3-13, Mar. 2007.

LUSTOSA, F. L. F.; OLIVEIRA, S. C. C.; ROMEIRO, L. A. Efeito alelopático de extrato aquoso de *Piper aduncum* L. e *Piper tectoniifolium* Kunth na germinação e crescimento de *Lactuca sativa* L. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 849-851, jul. 2007.

MAIA, J. G. S. et al. Espécies de Piper da Amazônia ricas em safrol. **Química Nova**, São Paulo, v. 10, n. 3, p. 200-204, maio 1987.

MASSAGUER, P. R. **Microbiologia dos processos alimentares**. São Paulo: Varela, 2005. 258p.

MAZZAFERA, P. Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-índia e eugenol. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 231-238, jun. 2003.

MCDONELL, G.; RUSSELL, A. D. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 12, n. 1, p. 147-79, jan. 1999.

MILICEVIC, D. R.; SKRINJAR, M.; BALTIC, T. Real and perceived risks for mycotoxin contamination in foods and feeds: challenges for food safety control. **Toxins**, Basel, v. 2, n. 4, p. 572-592, Apr. 2010.

MIRANDA, E. M. Caracterização e avaliação produtiva de uma população nativa de pimenta longa (*Piper hispidinervum*) no Seringal Cachoeira, AC, Brasil. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 32, n. 1, p. 9-20, 2002.

MOTA, M. G. C. et al. Coleta de germoplasma e distribuição geográfica de *Piper aduncum* L. na Amazônia Brasileira. In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS DA AMÉRICA LATINA E CARIBE, 3., 2001, Londrina. **Resumos...** Londrina: Embrapa, 2001. 1 CD-ROM.

MUNINBAZI, C.; BULLERMAN, L. Molds and mycotoxins in foods from Burundi. **Journal Food Protection**, Des Moines, v. 59, n. 8, p. 869-875, Aug. 1996.

NASCIMENTO, G. G. F. et al. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 31, n. 2, p. 247-256, Abr. 2000.

NDGIJIMANA, M. et al. Growth and metabolites production by *Penicillium brevicompactum* in yoghurt. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 127, n. 3, p. 276-283, Oct. 2008.

OLIVEIRA, C. A.; ALBUQUERQUE, P. C.; ROCHA, M. L. C. **Infecções hospitalares**. Rio de Janeiro: Atheneu, 1998.

OLIVEIRA, M. N.; LUNZ, A. M. P. **Coleta, conservação, caracterização e avaliação de genótipos de pimenta longa (*Piper hispidinervium*) no estado do Acre**. Rio Branco: Embrapa Acre, 1996.

OLSEN, S. J. et al. Surveillance for foodborne disease outbreaks - United States, 1993-1997. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 49, n. SS01, p. 1-51, Mar. 2000.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE LA SAÚDE. **Importância de la inocuidade de los alimentos para la salud y el desarrollo**. Genebra, 1984. 86p. (Série de Informes Técnicos, 705).

ORJALA, J. et al. Cytotoxic and antibacterial dihydrochalcones from the leaves of *Piper aduncum*, **Journal of Natural Products**, Columbus, v. 57, n. 1, p. 18-26, Jan. 1994.

OUSSALAH, M. et al. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, Wageningen, v. 18, n. 5, p. 414-420, May. 2007.

PELCZAR JÚNIOR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1996. v. 2.

PIMENTEL, F. A.; PEREIRA, J. B. M.; OLIVEIRA, M. N. **Zoneamento e caracterização de habitats naturais de pimenta longa (*Piper hispidinervium*) no Acre**. Rio Branco: Embrapa/CPAF/AC, 1998. 17p. (Boletim de Pesquisa, 20).

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 2. ed. London: Blackie Academic and Professional, 1997. 540 p.

RAINA, V. K. et al. Essential oil composition of *Syzygium aromaticum* leaf from Little Andaman, India. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 16, n. 5, p. 334-336, Mar. 2001.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, Oxford, v. 39, n. 5, p. 603-613, May 2001.

ROOBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e farmacobiocotecnologia**. São Paulo: Premier, 1997. 372p.

SÁ, C. P.; PIMENTEL, F. A. **Coefficientes técnicas e avaliação financeira da cultura de Pimenta Longa no Acre**. Rio Branco: Embrapa/CPAF/AC, 2001. (Comunicado Técnico, 151).

SAITO, M.; ENOMOTO, M.; TATSUNO, T. Yellowed rice toxins: luteoskyrin and related compounds, chlorine-containing compounds and citrinin. In: AJL, S. J. (Ed.). **Microbial toxins**. New York: Academic, 1971. v. 6, p. 299-380.

SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C. **Introduction to food and airborne fungi**. 7. ed. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2000. 389 p.

SANCHEZ-SALDANA, L.; ANDUAGA, E. S. Antisépticos y desinfectantes. **Dermatologia peruana**, Lima, v. 15, n. 2, p. 83-103, maio/ago. 2005.

SANTIAGO, E. J. A. et al. Aspectos da anatomia foliar da pimenta-longa (*Piper hispidinervium* c.dc.) sob diferentes condições de luminosidade. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 5, p. 1035-1042, set./out. 2001.

SANTOS, A. L. **Comportamento do *Staphylococcus aureus* em queijo minas frescal fabricado com leite cru**. 2004. 54 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

SANTOS, A. S. **Descrição de sistema e de métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório**. Brasília: Ministério da agricultura pecuária e abastecimento, 2004. (Comunicado Técnico, 99).

SANTOS, C. A. de M. **Plantas medicinais: herbarium flora et scientia**. 2. ed. São Paulo: Ícone/ Scientia et Labor, 1988. 160p.

SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 35, n. 4, p. 275-280, out./dez. 2004.

SCHROEDER, H. W. Effect of corn steep liquor on micelial growth and aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus*. **Applied Microbiology**, Washington, v. 14, n. 3, p. 381-385, may 1966.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Floresta**, Curitiba, v. 30, n. 1, p. 129-137, 2000.

SEGURA, A. et al. Snakin-1, a peptide from potato that is active against plant pathogens. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Columbia, v. 12, n. 1, p. 16-23, 1999.

SILVA, M. H. L. **Tecnologias para o desenvolvimento agro-industrial de *Piper aduncum* L.** 2004. 78p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

SILVA, N. et al. Ocorrência de *Escherichia coli* 0157:H7 em vegetais e resistência aos agentes de desinfecção de verduras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 2, p. 167-173, 2003.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFSC, 2007. 1104 p.

SIVROUPOULOU, A. et al. Antimicrobial activity of mint essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 43, n. 9, p. 2384-2388, Sept. 1995.

SMITH, R. M.; KASSIM, H. The essential oil of *Piper aduncum* from Fiji. **New Zealand Journal of Science**, Wellington, v. 22, p. 127-128, 1979.

SOUZA, E. L.; LIMA, E. O.; NARAIN, N. Especiarias: uma alternativa para o controle da qualidade sanitária e de vida útil de alimentos, frente às novas perspectivas da indústria alimentícia. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 113, p. 38-42, out. 2003.

TAEGER, A.J. Listeriosis: recognizing it, treating it, preventing it. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, Cleveland, v. 66, n. 6, p. 375-380, 1999.

THOMAZINI, M. J. **Levantamento da entomofauna associada à pimenta longa no estado do Acre**. Rio Branco: Embrapa, 1999. (Boletim de pesquisa, 141).

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2004. 718p.

UPNMOOR, I. **Cultivo de plantas medicinais, aromáticas e condimentares**. Guaíba: Agropecuária, 2003. 56 p.

VARGA, J. et al. Evolutionary relationships among *Aspergillus* species producing economically important mycotoxins. **Food Technology Biotechnology**, Zagreb, v. 41, n. 1, p. 30-32, Mar. 2003.

YUKAWA, T. A. et al. Prophylactic treatment of cytomegalovirus infection with traditional herbs. **Antiviral Research**, Leuven, v. 32, n. 2, p. 63-70, Oct. 1996.

YUNCKER, T. G. **The piperaceae of Brazil**. São Paulo: Hoehnea, 1972. v. 2, 266p.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argros, 2001. 500p.

CAPÍTULO 2: Caracterização química e potencial biocida dos óleos essenciais de *Piper aduncum*, *Piper hispidinervum* E *Syzygium aromaticum* sobre microrganismos patogênicos e toxigênicos importantes para a indústria de alimentos

RESUMO

Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a caracterização química e o potencial biocida dos óleos essenciais de *Piper aduncum*, *Piper hispidinervum* e *Syzygium aromaticum* sobre microrganismos patogênicos e toxigênicos importantes para indústria de alimentos. A obtenção do óleo essencial foi realizada pela técnica de hidrodestilação, utilizando o aparelho de Clevenger modificado e a identificação e a quantificação dos constituintes, pelas análises em CG/EM e CG-DIC. A atividade biológica dos óleos essenciais nas bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila* e na levedura *Candida albicans* foi determinada pela técnica de perfuração em ágar. Para o efeito inibitório dos fungos filamentosos *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium solitum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus parasiticus* foi utilizado o teste de difusão em disco. Nas análises cromatográficas, os constituintes majoritários encontrados no óleo essencial de *Piper aduncum* foram (E)-nerolidol (19,30%) e trans-sabineno hidratado (18,79%); no óleo de *Piper hispidinervum*, o safrol (73,44%) e p-menta-2,4(8)-dieno (18,78%) e, no óleo de *Syzygium aromaticum*, o eugenol (89,08%). O resultado da concentração mínima inibitória (CMI) demonstrou que todos os microrganismos testados apresentaram sensibilidade ao óleo de *S. aromaticum*, sendo os mais sensíveis *A. hydrophila*, *E. coli* e *C. cladosporioides*. Das duas espécies de Piperaceae testadas, o óleo de *P. Hispidinervum* foi mais eficiente para os fungos, não apresentando inibição somente para *C. albicans*, *A. flavus* e *P. brevicompactum* e menos eficiente para as bactérias, apresentando forte inibição somente para *A. hydrophila*. O óleo essencial de *P. aduncum* apresentou atividade antimicrobiana somente para *A. hydrophila*, *S. aureus*, *A. fumigatus* e *P. brevicompactum*.

Palavras-chave: Potencial biocida. Óleo essencial. Microrganismos.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the chemical characterization biocide potential of essential oils of *Piper aduncum*, *Piper hispidinervum* and *Syzygium aromaticum* on pathogenic and toxigenic microorganisms important to food industry. The obtainment of essential oil was performed by hydrodistillation technique using the modified Clevenger apparatus, and the identification and quantification of the constituents by analysis in GC / MS and GC-FID. The biological activity of essential oils on bacteria *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila* and the yeast *Candida albicans* was determined by Agar Perforating technique. For the inhibitory effect of filamentous fungi *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium solitum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus parasiticus* was used the disk diffusion test. In chromatographic analyzes, the major constituents found in essential oil of *Piper aduncum* were (E)-nerolidol (19.30%) and trans-sabinene hydrate (18.79%), in the oil of *Piper hispidinervum* were safrole (73.44%) and p-mint-2,4(8)-diene (18.78%) and in the *Syzygium aromaticum* oil, eugenol (89.08%). The result of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) showed that all microorganisms tested showed sensitivity to oil of *S. aromaticum*, being the most sensitive *A. hydrophila*, *E. coli* and *C. cladosporioides*. For the two species of Piperaceae tested, the oil of *P. Hispidinervum* was more efficient for the fungi, showing no inhibition only for *C. albicans*, *A. flavus* and *P. brevicompactum* and less efficient for bacteria, presenting strong inhibition only for *A. hydrophila*. The essential oil of *P. aduncum* showed antimicrobial activity only for *A. hydrophila*, *S. aureus*, *A. fumigatus* and *P. brevicompactum*.

Keywords: Biocide potential. Essential oil. Microorganisms.

1 INTRODUÇÃO

Desde o início das notificações de surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs), de 1999 até 2008, foram notificados ao Ministério da Saúde, 6.062 surtos, com o acometimento de 117.330 pessoas doentes e registro de 64 óbitos, sendo as bactérias o agente etiológico de 84% dos surtos. Os principais microrganismos envolvidos em surtos de DTAs no Brasil são *Salmonella* spp, *Staphylococcus* sp., *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella Enteritidis* e *Shigella* sp. (BRASIL, 2008)

Os óleos essenciais obtidos de plantas servem como uma fonte alternativa de agentes antimicrobianos contra esses patógenos causadores de toxinfecções alimentares ou microrganismos deterioradores, sendo eles causadores de diversos prejuízos para as indústrias alimentícias (KOTZEKIDO; GIANNAKIDIS; BOULMATIS, 2007).

As plantas aromáticas, condimentares e medicinais têm sido utilizadas por um público cada vez maior, recebendo incentivos da Organização Mundial de Saúde (OMS), que recomenda que seus países membros desenvolvam pesquisas visando o uso da flora. Esses elementos que antes se apresentavam, principalmente, como agentes vetores de aromas e gostos característicos dos alimentos, apresentam agora uma nova perspectiva de emprego (OZCAN; ERKMEN, 2001).

Os óleos essenciais são produtos voláteis do metabolismo secundário das plantas, normalmente formados em células especiais ou grupos de células encontrados em muitas folhas e caules de plantas. Eles são comumente concentrados em uma região em particular na planta e, quando ocorrem em vários órgãos em uma mesma planta, têm diferentes perfis de composição (OUSSALAH et al., 2007). Foi demonstrado em estudos que esses óleos podem

apresentar ação inibitória contra bactérias, fungos filamentosos e leveduras (ARAÚJO, 2005; SARTORATTO et al., 2004; SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; CRUZ, 2000).

As espécies *Piper aduncum* L. e *Piper hispidinervum* ocorrem naturalmente na Amazônia e pertencem à família Piperaceae (MOTA et al., 2001). Os constituintes químicos da composição do óleo essencial da espécie *Piper aduncum* são cânfora, monoterpenos, sesquiterpenos e dilapiol (GOTTLIEB et al., 1981). O dilapiol é o composto majoritário, conforme descrito por Maia et al. (1998). Este composto é um éter fenílico que vem sendo testado com êxito como fungicida, moluscicida, acaricida, bactericida e larvicida, com a vantagem de ser um produto biodegradável (SILVA, 2004).

A *Piper hispidinervum*, por apresentar teores de safrol acima de 90% em seu óleo essencial, vem despertando o interesse das empresas processadoras que utilizam óleos ricos em safrol (SÁ; PIMENTEL, 2001). Isso porque essa substância é utilizada como precursora na fabricação de inseticidas biodegradáveis, cosméticos e produtos farmacêuticos.

A *Syzygium aromaticum* (L.) é endêmica nas Molucas do Norte (Arquipélago de Molucas, Indonésia). Seu óleo essencial é constituído principalmente de eugenol, acetato de eugenol, humuleno e outros compostos, como ácido oleanólico, vanilina, ácido galotânico (ROOBERS et al., 1997). Possui ampla utilização, atuando como estimulante estomacal, aromático e antisséptico, sendo utilizado também como expectorante nas bronquites e como condimento versátil nas indústrias de perfumaria. Em alguns trabalhos foi demonstrado que os constituintes de *S. aromaticum* apresentam atividade bactericida (DORMAN; DEANS, 2000; NASCIMENTO et al., 2000), inseticida (EL-HAG; EL-NADI; ZAITOON, 1999), antiviral (YUKAWA et al., 1996) e

fungicida (DELESPAUL et al., 2000), sendo uma alternativa promissora no controle de ácaros fitófagos (GONÇALVES et al., 2001).

Dessa forma, este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a caracterização química e o potencial biocida dos óleos essenciais de *Piper hispidinervum*, *Piper aduncum* e *Syzygium aromaticum* frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, *Candida albicans*, *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium solitum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus parasiticus*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

As plantas *Piper hispidinervum* e *Piper aduncum* foram obtidas no campus da Universidade Federal de Lavras (altitude: 920 m; coordenadas: 21°13'50" Sul e 44°58'27" Oeste), em abril de 2009, às 8h00, com temperatura em torno de 21°C e ausência de chuvas. Foram coletadas as folhas jovens de *Piper hispidinervum* e *Piper aduncum*. A espécie de *Syzygium aromaticum* foi obtida em um estabelecimento comercial da cidade de Belo Horizonte, MG.

2.2 Óleos essenciais

2.2.1 Extração dos óleos

A extração dos óleos essenciais dos vegetais foi realizada no Laboratório de Química Orgânica do Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG.

Fragmentos das folhas frescas de *Piper hispidinervum* (328g) e *Piper aduncum* (289g) e os botões florais de *Syzygium aromaticum* (300g) foram acondicionados a balões de 6 litros e submetidos ao processo de hidrodestilação, utilizando-se o aparelho de Clevenger modificado, por 2 horas, para a obtenção do hidrolato (GUIMARÃES et al., 2008). Para aumentar a superfície de contato e obter maior quantidade de óleo essencial, o material vegetal fresco foi picado em quadrados pequenos (CASTRO, 2004). Decorrido esse tempo, coletou-se o hidrolato, centrifugou-se em centrífuga de bancada de cruzeta horizontal (Fanem Baby®I Modelo 206 BL), a 965,36 x G, por 5 minutos. Esse procedimento foi

realizado para os óleos de *Piper hispidinervum* e *Syzygium aromaticum*. Para a amostra de *Piper aduncum*, foi realizado o particionamento com solvente (diclorometano) para a obtenção do óleo desejado. O óleo essencial foi retirado com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e acondicionado em frasco de vidro âmbar envolto com papel alumínio, mantido sob refrigeração.

2.2.2 Determinação da umidade

A determinação da umidade foi realizada simultaneamente ao processo de extração do óleo. Para tanto, utilizaram-se 5 g do material vegetal picado e submergido em 80 mL de ciclohexano em balão volumétrico com capacidade de 250 mL. O balão foi acoplado ao condensador e aquecido, por meio de manta aquecedora, por 2 horas. O volume de água presente na amostra foi quantificado com o auxílio do coletor volumetricamente graduado (PIMENTEL et al., 2006).

O rendimento do óleo essencial foi calculado e expresso em peso de óleo por peso de material com base livre de umidade (% p/p BLU).

2.2.3 Identificação e quantificação dos constituintes dos óleos essenciais

A análise qualitativa do óleo essencial foi realizada por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/EM - Shimadzu, modelo QP 5050A), na Universidade Federal de Sergipe, sob as seguintes condições experimentais: coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm) com fase ligada DB5 (0,25 µm de espessura de filme); hélio (He) como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL/min. A temperatura foi programada mantendo-se 50°C por 1min30, seguindo de um aumento de 4°C/min, até atingir 200°C, depois a 10°C, até atingir 250°C, mantendo-se constante essa temperatura por 5 minutos. A

temperatura do injetor era de 250°C e a temperatura do detector (ou interface), de 280°C. O volume da amostra injetada foi de 0,5µL em acetato de etila; taxa de partição do volume injetado de 1:100 e pressão na coluna de 64.20 kPa. As condições do espectrômetro de massas foram: detector de varredura 1.000; intervalo de varredura de 0,50 fragmento e fragmentos detectados na faixa de 40 a 500 Da.

A identificação dos constituintes foi realizada com base na comparação dos índices de retenção da literatura (ADAMS, 2007). Para o índice de retenção, foi utilizada a equação de Van den Dool e Kratz (1963) em relação à série homóloga de n-alcenos (nC8-nC18) e fazendo-se a extrapolação para C19 e C20. Também foram utilizadas duas bibliotecas do equipamento NIST107 e NIST21, que permitem a comparação dos dados dos espectros com aqueles existentes nas bibliotecas.

A análise quantitativa foi realizada no Laboratório de Química Orgânica da UFLA, utilizando-se cromatógrafo gasoso Shimadzu CG – 17A, equipado com detector por ionização de chamas (DIC), nas seguintes condições experimentais: coluna capilar DB5; programação da coluna: temperatura inicial de 40°C até 240°C; temperatura do injetor de 220°C; temperatura de detector de 240°C; gás carreador nitrogênio (2,2 mL.min⁻¹); taxa de split de 1:10; volume injetado de 1 µL (1% de solução em diclorometano) e pressão na coluna de 115 KPa, sendo a quantificação de cada constituinte obtida por meio de normalização de áreas (%).

2.3 Potencial biocida dos óleos essenciais

O potencial biocida dos óleos essenciais foi determinado no Laboratório de Microbiologia de Alimentos de Departamento de Ciência dos Alimentos da UFLA, em Lavras, MG.

2.3.1 Microrganismos

Os microrganismos utilizados foram *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella typhi* ATCC 6539, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, *Candida albicans* ATCC 10231, *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium solitum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus parasiticus*.

2.3.2 Manutenção e ativação dos microrganismos testados

Durante o experimento, os microrganismos foram mantidos, em tubos contendo meio de congelamento, sob refrigeração (4 °C).

As culturas bacterianas e de levedura foram ativadas em caldo BHI (caldo-infusão de cérebro e coração) e, posteriormente, incubadas em condições adequadas, a 37°C, por 24 horas, para a obtenção do inóculo. Os fungos foram inoculados em meio de cultura malt extract Agar (MA) e incubados em BOD, a 25°C, por 5 dias .

2.3.3 Efeito biocida dos óleos essenciais sobre bactérias e levedura

A atividade biocida dos óleos essenciais em bactérias foi determinada pela técnica de perfuração em ágar (OSTROSKY et al., 2008). Para padronizar a densidade do inóculo bacteriano, utilizou-se o controle de turbidez de equivalente a uma solução padrão McFarland de 0,5, o que resulta numa suspensão contendo aproximadamente de $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ UFC/mL. A densidade correta do controle de turbidez foi verificada utilizando-se um espectrofotômetro Shimadzu UV-160 1 PC, no comprimento de onda de 625 nm, em que a absorbância ocorreu entre 0,08 a 0,10, como recomendado por National Committee for Clinical Laboratory Standards - NCCLS (2003).

Após a ativação das bactérias, alíquotas foram transferidas para um tubo com 5 mL de caldo peptona de caseína e soja (TSB). Os tubos foram incubados a 37°C, até turbidez de uma solução-padrão McFarland de 0,5, resultando em uma suspensão contendo 10^8 UFC.mL⁻¹.

Para a avaliação do efeito inibitório *in vitro* dos óleos de *Piper hispidinervum*, *Piper aduncum* e *Syzygium aromaticum*, a concentração de inóculo obtida pela escala McFarland de 0,5 (10^8 UFC.mL⁻¹) foi diluída até atingir a concentração de 10^6 UFC.mL⁻¹.

Para a realização da técnica de perfuração em ágar, os poços de deposição dos óleos essenciais foram feitos no Agar, com o auxílio de pérolas de vidro esterilizadas de 5 mm, retiradas previamente. Em seguida, foram transferidos para os poços 10 µL dos óleos essenciais diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO), nas concentrações de 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,62, 7,81 e 3,9 µg/mL conforme Senthilkumar, Kannathasan e Venkatesalu (2009) com modificações. Para as culturas de *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella typhi* ATCC 6539 e

Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027 foi utilizado o ágar Miller Hinton, *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 em ágar Triptic Soy Agar (TSA), *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 TSA-YA e *Candida albicans* ATCC 10231 em MEA.

As placas contendo as culturas bacterianas foram incubadas em BOD, a 37°C, por 24 horas e as contendo *Candida albicans* em BOD, a 25°C, por 72 horas (OSTROSKY et al., 2008). O controle negativo foi realizado com 10 µL de DMSO (dimetilsulfóxido) e, para controle positivo, foi utilizado clorafenicol (1g/L) (RABANAL ET AL., 2002; GUERRINI ET AL., 2009).

2.3.4 Efeito biocida dos óleos essenciais sobre fungos filamentosos

Para o efeito inibitório de fungos filamentosos, foi utilizado o teste de difusão em disco aceito pelo Food and Drug Administration (FDA) e estabelecido como padrão pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (BARRY; THORNSBERRY, 1991). Para tanto, foi utilizado um inóculo na concentração de 10⁶ esporos/mL, com contagem em câmara de Neubauer. Posteriormente, esse inóculo foi transferido para a placa contendo meio *extract malt Agar* (MEA) pela técnica de espalhamento em superfície. Discos de papel de filtro de 6 mm de diâmetro embebidos com 5 µL dos óleos nas concentrações de 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,62, 7,81 e 3,9 µg.mL⁻¹ foram colocados sobre o meio de cultura, como sugerido por Karaman et al. (2003). O controle negativo foi realizado por meio de discos impregnados com 10 µL de DMSO (dimetilsulfóxido) e, para controle positivo, foi utilizado um fungicida controle (cloreto de benzalcônio). As placas foram incubadas em BOD, a 25°C, por um período de 72 horas.

2.3.5 Avaliação do efeito biocida

A avaliação foi comparativa frente a um padrão biológico de referência (controle positivo) e a zona ou o halo de inibição de crescimento foi medida partindo-se da circunferência do disco ou poço, até a margem onde houve crescimento de microrganismos (BARRY; THORNSBERRY, 1991). Realizaram-se medições ortogonais do diâmetro, tendo cada medição correspondido à média de duas medidas diametralmente opostas (ZACARONI et al., 2009). A concentração mínima inibitória (CMI) foi definida como a menor concentração de óleo essencial, na qual se identificou a presença de halo de inibição.

2.3.6 Análise estatística

Para a análise estatística, utilizou-se o delineamento em blocos inteiramente casualizados, com esquema fatorial de 15 x 3 x 9 (microrganismos x óleo essencial x concentração), com três repetições. O programa estatístico empregado foi o SISVAR (FERREIRA, 2003). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Óleos essenciais

3.1.1 Rendimento

Pelos dados da Tabela 1, observa-se que os rendimentos dos óleos essenciais foram de 2,48% para as folhas frescas de *Piper Hispidinervum*, de 0,56% para as folhas frescas de *Piper aduncum* e de 1,14% para os botões florais de *Syzygium aromaticum*. O maior rendimento constatado foi o de *Piper Hispidinervum*. Valores superiores aos encontrados neste trabalho foram relatados por Fazolin et al. (2007) que obtiveram rendimento dos óleos na faixa de 3,0% a 3,5%, para *P. hispidinervum* e de 2,0% a 2,2% para *P. aduncum*. Foi demonstrado em alguns estudos que a concentração de óleo dentro de uma mesma espécie de determinadas plantas pode variar, influenciada por fatores hereditários, que dizem respeito às interferências quantitativas e qualitativas, e por fatores ontogênicos, como solo, clima e microrganismos (CARDOSO et al., 2001). Grande parte dos estudos incluindo *Piper hispidinervum* e *Piper aduncum* é realizada no estado do Acre, que possui diferenças sazonais significativas em relação ao sul de Minas, o que pode ter interferido no rendimento do óleo dessas espécies.

Tabela 1 Rendimentos dos óleos essenciais de *Piper hispidinervum*, *Piper aduncum* e *Syzygium aromaticum* em base livre de umidade (% p/p BLU).

Material vegetal	Massa (g)	Óleo essencial (%)	Umidade (%)
<i>Piper aduncum</i>	289	0,56	76
<i>Piper hispidinervum</i>	328	2,48	72,7
<i>Syzygium aromaticum</i>	300	1,14	7,3

Santos (2005) obteve rendimento de 1,1% em botões florais secos de *Syzygium aromaticum*, resultado semelhante ao encontrado neste estudo, 1,14% e inferior ao encontrado por Pereira (2008) que relatou rendimento de 2,32%.

A obtenção do rendimento do óleo essencial torna-se importante, uma vez que está diretamente relacionado com a sua viabilidade econômica.

3.1.2 Identificação e quantificação dos constituintes dos óleos essenciais

3.1.2.1 Identificação e quantificação dos constituintes do óleo essencial de *Piper aduncum*

Os constituintes principais encontrados no óleo essencial de *Piper aduncum* estão descritos na Tabela 2. Os compostos majoritários foram (E)-nerolidol (19,30%), trans-sabineno hidratado (18,79%), (E)- β -ocimeno (7,84%), biciclogermacreno (5,26 %) e α -humuleno (4,44%) (Figura 8).

Navickiene et al. (2006) estudaram o óleo essencial de *Piper aduncum* e encontraram, como compostos majoritários, linalol (31,7%), biciclogermacreno (11,2%), nerolidol (10,4%) e β -cariofileno (9,1%), resultados diferentes ao deste estudo, exceto pela presença do biciclogermacreno e nerolidol. Fazolin et al. (2007) apontaram, como componente majoritário do óleo essencial de *P. aduncum*, o dilapiol (73,97%), composto que não foi identificado neste estudo. De acordo com Burt (2004), essas variações podem ser atribuídas a diferenças de época de colheita, tipo de solo, clima da região e umidade relativa do ar no dia da coleta.

Tabela 2 Composição química do óleo essencial das folhas frescas de *Piper aduncum*

Compostos	TR	IRRlit	IRRcal	%
(E)-nerolidol	30,703	1563	1563	19,30
trans-sabineno hidratado	10,774	1098	1102	18,79
(E)- β - ocimeno	8,788	1050	1046	7,84
Biciclogermacreno	27,888	1500	1495	5,26
α -humuleno	26,055	1454	1455	4,44
α -muuroleno	27,229	1479	1481	4,00
(Z)- β - ocimeno	8,406	1037	1035	3,16
(E)-cariofileno	24,597	1419	1419	3,22
Óxido de cariofileno	31,461	1583	1582	2,87

TR= tempo de retenção (minutos), IRRlit = índice de retenção da literatura (Adams, 2007), IRRcal = índice de retenção calculado pela equação de Kovats , % =concentração em porcentagem.

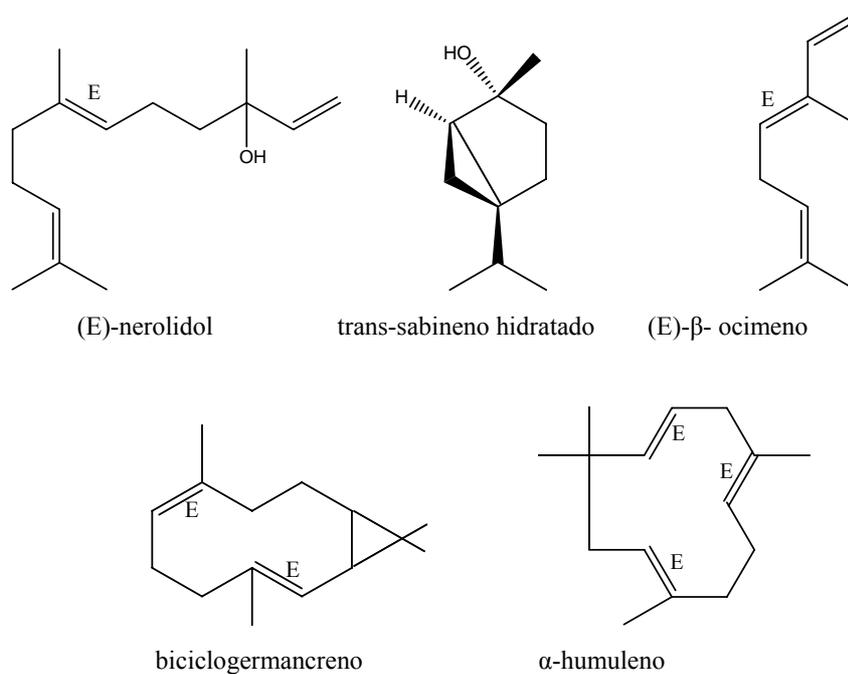


Figura 8 Estruturas químicas dos compostos majoritários presentes no óleo essencial de *Piper aduncum*.

3.1.2.2 Identificação e quantificação dos constituintes do óleo essencial de *Piper hispidinervum*

Na Tabela 3 estão descritos os nove constituintes identificados no óleo essencial de *Piper hispidinervum*, sendo safrol (73%) e *p*-menta-2,4(8)-diene (18,78%) os componentes majoritários (Figura 9)

Tabela 3 Composição química do óleo essencial das folhas frescas de *Piper hispidinervum*

Compostos	TR	IRRLit	IRRcal	%
Safrol	18,981	1287	1293	73,44
<i>p</i> -menta-2,4(8)-diene	10,329	1088	1085	18,78
δ -3-careno	7,516	1011	1008	1,65
(Z)- β -ocimeno	8,762	1037	1035	1,46
Mirceno	6,865	990	988	0,87
α -terpineno	8,122	1017	1016	0,84
α -pineno	5,369	939	932	0,83
Limoneno	8,389	1029	1028	0,58
(E)- β -ocimeno	9,169	1050	1045	0,58

TR= tempo de retenção (minutos), IRRLit = índice de retenção da literatura (Adams, 2007), IRRcal = índice de retenção calculado pela equação de Kovats, % = concentração em porcentagem.

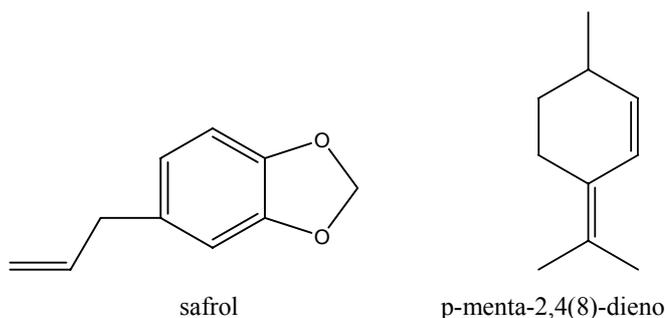


Figura 9 Estruturas químicas dos compostos majoritários presentes no óleo essencial de *Piper hispidinervum*.

No estudo de Lima et al. (2009), verificou-se que o óleo essencial de *P. hispidinervum* apresentou, como composto majoritário, o safrol (82,0 %) e, em baixas concentrações, α -pineno (0,6%), δ -3-careno (1,4%) e α -terpinoleno (13,5%). Nascimento et al. (2008) constataram 82,5% de safrol e, em menores concentrações, os monoterpenos α -pino (0,68%), δ -3-careno (1,31%) e α -terpinoleno (13,38%) no óleo essencial de *P. hispidinervum*. Dados de Miranda (2002) indicam que o óleo essencial desta espécie é rico em safrol (92%) e que essa substância concentra-se, principalmente, nas folhas e nos ramos secundários. Zacaroni et al. (2009) também identificaram como composto majoritário o safrol (89%). Esses dados corroboram aqueles encontrados neste trabalho para o composto majoritário (safrol).

O menor teor de safrol encontrado no óleo essencial estudado pode ser decorrente da variação de fatores como sazonalidade, desenvolvimento da planta, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta e fontes de nutrientes (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

3.1.2.3 Identificação e quantificação dos constituintes do óleo essencial de *Syzygium aromaticum*

No óleo essencial de *Syzygium aromaticum* foram identificados três constituintes (Tabela 4), sendo o eugenol (89,08%) o composto majoritário.

Em pesquisas realizadas por Pereira (2008), com *S. aromaticum*, foi demonstrado que o eugenol (86,3%) foi o principal componente, seguido de trans-cariofileno (8,2%), α -humuleno (0,8%) e acetato de eugenila (3,6%). No presente estudo, também se obteve o eugenol como composto majoritário; porém, o constituinte minoritário, acetato de eugenila, não foi identificado.

Segundo Mazzafera (2003), os óleos essenciais de *S. aromaticum* apresentam as seguintes variações: eugenol, 70% a 85%; acetato de eugenila,

15% e β -cariofileno, 5% a 12%. Oliveira et al. (2009), avaliando a composição do óleo essencial de botões florais de *S. aromaticum*, verificaram a presença de eugenol (88,38%), β -cariofileno (0,64%) e acetato de eugenila (10,98%). Esses dados concordam com os obtidos neste estudo, em relação ao elevado teor de eugenol na composição do óleo essencial de botões florais de *Syzygium aromaticum* e difere por alguns constituintes minoritários. Estas diferenças podem estar relacionadas com a idade e a origem dos botões florais, região de plantio, método de extração do óleo essencial e outros.

Tabela 4 Composição química do óleo essencial dos botões florais secos de *Syzygium aromaticum*

Compostos	TR	IRRlit	IRRcal	%
Eugenol	28,773	1359	1354	89,08
trans-cariofileno	31,234	1419	1417	5,86
α - humuleno	35,802	1454	1453	2,30

TR= tempo de retenção (minutos), IRRlit = índice de retenção da literatura (Adams, 2007), IRRcal = índice de retenção calculado pela equação de Kovats , % = concentração em porcentagem.

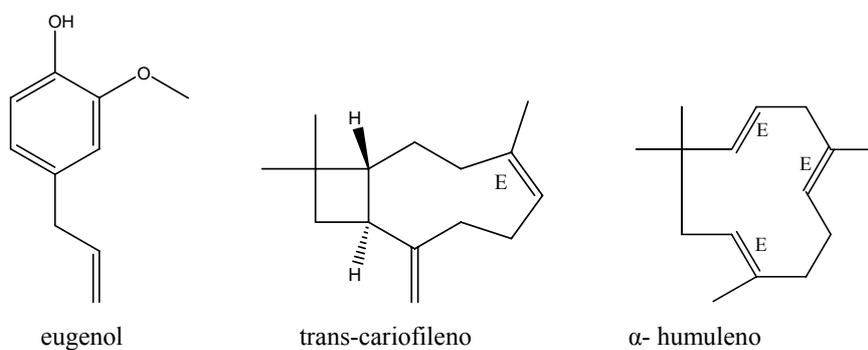


Figura 10 Estruturas químicas dos compostos majoritários presentes no óleo essencial de *Syzygium aromaticum*

3.1.3 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Piper hispidinervum*, *Piper aduncum* e *Syzygium aromaticum*, para os microrganismos em estudo, está expressa na Tabela 5.

Tabela 5 A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Piper aduncum*, *Piper hispidinervum* e *Syzygium aromaticum*

Microrganismos	Zona de inibição (mm) ^a / Concentração mínima inibitória (CMI)					
	<i>P. aduncum</i> (10µl/ slot)		<i>P. Hispidinervum</i> (10 µl/ slot)		<i>S. aromaticum</i> (10 µl/ slot)	
Bactéria	ZI (mm)	CMI (µg/mL)	ZI (mm)	CMI (µg/mL)	ZI (mm)	CMI (µg/mL)
<i>A. hydrophila</i>	1,0±0,0	250,0	4,0±1,0	250	1,7±0,3	15,6
<i>E. coli</i>	NI	-	NI	-	1,0±0,0	15,6
<i>L. monocitogens</i>	NI	-	NI	-	1,3±0,6	62,5
<i>P. aeruginosa</i>	NI	-	NI	-	2,7±0,3	62,5
<i>S. typhi</i>	NI	-	NI	-	1,7±0,5	31,2
<i>S. aureus</i>	1,3±0,3	500,0	NI	-	2,0±0,3	62,5
Levedura						
<i>Candida albicans</i>	NI	-	NI	-	2,7±0,5	125
Fungos filamentosos	<i>P. aduncum</i> (5 µL/ disc)		<i>P. Hispidinervum</i> (5 µL/ disc)		<i>S. aromaticum</i> (5 µL/ disc)	
<i>A. flavus</i>	NI	-	NI	-	3,7±1,2	62,5
<i>A. fumigatus</i>	3,0±1,0	500,0	3,0±0,0	500,0	20,0±1,0	125
<i>A. niger</i>	NI	-	3,0±0,0	500,0	4,7±0,6	62,5
<i>A. parasiticus</i>	NI	-	2,0±0,0	500,0	14,0±0,0	125
<i>C. cladosporioides</i>	NI	-	2,7±0,6	250,0	2,7±0,6	31,25
<i>P. brevicompactum</i>	4,0±0,3	500,0	NI	-	15,3±1,0	125
<i>P. citrinum</i>	NI	-	2,7±0,6	500,0	3,7±1,2	62,5
<i>P. solitum</i>	NI	-	1,0±0,0	250,0	2,0±0,0	62,5

NI: Ausência de inibição, (-): não identificado.

O resultado da CMI do óleo de *S. aromaticum* indica que todos os microrganismos testados apresentaram sensibilidade em uma concentração ≤ 125 µg/mL, sendo *Aeromonas hydrophila* e *Escherichia coli* as mais sensíveis, com o CMI de 15,6 µg/mL. Estes resultados indicam que o óleo essencial de *S. aromaticum* pode ser utilizado no controle destas bactérias.

O óleo de *S. aromaticum* mostrou forte atividade antifúngica nas concentrações de 31,25-125,0 µg/mL. Os fungos mais resistentes foram *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus parasiticus* e *P. brevicompactum*. *Cladosporium cladosporioides* foi o fungo que apresentou maior sensibilidade ao óleo mencionado.

Não há consenso sobre o nível de inibição aceitável para materiais de plantas. De acordo com Aligianis et al. (2001), uma classificação para materiais vegetais, com base nos resultados de CMI, é: forte inibição (CMI até 500 µg/mL), inibição moderada (CMI entre 600 e 1.500 µg/mL) e como fraca inibição (CMI acima de 1.600 µg/mL). De acordo com os resultados da Tabela 5, o óleo essencial de *S. aromaticum* pode ser considerado um forte inibidor, uma vez que apresentou ação inibitória em todos os microrganismos testados, com valores de $CMI \leq 500$ µg/mL.

Alguns estudos têm demonstrado que os componentes de *S. aromaticum* são bactericidas contra *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (DORMAN; DEANS, 2000), assim como outras bactérias e leveduras (HOFFMANN et al., 1999; NASCIMENTO et al., 2000) e fungicidas (DELESPAUL et al., 2000; DZAMIC et al., 2009). A ação bactericida do óleo essencial de *S. aromaticum*, segundo Craveiro (1981), pode estar relacionada ao seu composto majoritário, o eugenol, pois ele provoca inibição na produção de amilase e proteases pela célula, bem como sua deterioração e lise. Esse princípio ativo é muito utilizado na odontologia como componente de seladores e outros produtos antissépticos.

O óleo de *P. hispidinervum* foi mais eficiente para os fungos analisados, não apresentando inibição nas concentrações testadas somente para *Candida albicans*, *Aspergillus flavus* e *Penicillium brevicompactum* e menos eficiente

para as bactérias, apresentando forte inibição somente para *Aeromonas hydrophila* (250 µg/mL).

O óleo essencial de *P. aduncum* apresentou atividade antimicrobiana específica para *A. hydrophila* (250 µg/mL), *S. aureus* (500 µg/mL), *Aspergillus fumigatus* e *P. brevicompactum* (500,0 µg/mL). Pode-se notar que foram necessárias concentrações mais elevadas do óleo essencial para um controle de poucas espécies, quatro dos quinze microrganismos avaliados.

Navickiene et al. (2006) relataram a baixa atividade fungicida do óleo essencial de folhas e hastes de *P. aduncum* sobre o fungo *Cladosporium cladosporioides*. Contudo, a eficiência foi maior quando o óleo foi extraído dos frutos. Neste estudo, a baixa atividade sobre *C. cladosporioides* também foi observada.

Duarte et al. (2007), avaliando a ação inibitória do óleo de *P. aduncum* sobre treze sorotipos de *E. coli*, encontraram valores de CMI_s ≥ 500 µg/mL, chegando a CMI_s superiores a 1.000 µg/mL, demonstrando um baixo potencial biocida para estes microrganismos. Neste estudo, concentrações inferiores a 500 µg/mL também foram ineficientes contra o *E. coli*, estando, portanto, de acordo com os valores encontrados na literatura.

Esses resultados podem ser justificados pelo fato de o óleo essencial de *P. aduncum* utilizado neste estudo ter como composto majoritário o (E)-nerolidol e não o dilapiol mencionado por Fazolin et al. (2007). Segundo Silva (2004), o dilapiol é um éter fenílico que vem sendo testado com êxito como fungicida, moluscicida, acaricida, bactericida e larvicida, com a vantagem de ser um produto biodegradável.

Os estudos demonstraram que os potenciais biocidas de *P. aduncum* e *P. hispidinervum* são contraditórios (DUARTE et al., 2007; GUERRINI, et al. 2009), podendo ser estes resultados influenciados pela origem da planta, técnica

analítica, metodologia de extração do óleo, concentrações e microrganismos testados.

As duas espécies de Piperaceas testadas apresentaram potencial biocida inferior ao óleo essencial de *S. aromaticum* tanto contra bactérias quanto contra leveduras e fungos filamentosos. A avaliação do efeito inibitório de óleos essenciais sobre microrganismos pode ser vista na Figura 11.

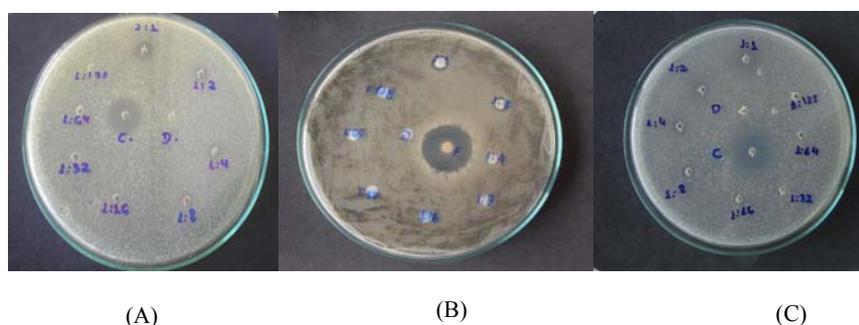


Figura 11 fotografia do efeito inibitório (A) Efeito inibitório de *S. aromaticum* sobre *S. aureus* (B) Efeito inibitório de *S. aromaticum* sobre *E. coli* (C) Efeito inibitório de *P. hispidinervum* sobre *C. cladosporioides*.

4 CONCLUSÃO

Os constituintes majoritários encontrados no óleo essencial de *Piper aduncum* foram (E)-nerolidol (19,30%), trans-sabineno hidratado (18,79%), (E)- β -ocimeno (7,84%), biciclogermacreno (5,26 %) e α -humuleno (4,44%); no óleo essencial de *Piper hispidinervum*, foram identificados o safrol (73%) e *p*-menta-2,4(8)-dieno (18,78%) como componentes majoritários; no óleo essencial de botões florais de *Syzygium aromaticum* foi identificado o eugenol (89,08%) como composto majoritário.

O óleo essencial de *Syzygium aromaticum*, na concentração de 125 $\mu\text{g/mL}$, foi capaz de inibir o desenvolvimento de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, *Candida albicans*, *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium solitum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus parasiticus*.

O óleo essencial de *Piper aduncum*, na concentração de 500,0 $\mu\text{g/mL}$, inibiu somente *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus fumigatus* e *Penicillium brevicompactum* e apresentou atividade antimicrobiana específica para *A. hydrophila*, na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$.

O óleo de *Piper hispidinervum* inibiu somente a bactéria *Aeromonas hydrophila* na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$, não apresentando inibição nas concentrações testadas para *Candida albicans*, *Aspergillus flavus* e *Penicillium brevicompactum*.

O óleo essencial de *Syzygium aromaticum* foi mais eficiente que o óleo essencial de *Piper aduncum* e *Piper hispidinervum*.

Aeromonas hydrophila foi a bactéria mais sensível a todos os óleos testados.

O óleo essencial de *Syzygium aromaticum* demonstrou ser eficiente no controle de microrganismos patogênicos e deterioradores, de origem alimentar, podendo ser utilizado na formulação de produtos de higienização.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oils components by gas chromatography/ mass spectroscopy**. 4. ed. Carol Stream: Allured, 2007. 804p.
- ALIGIANIS, N. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two Origanum species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 9, p. 4168-4170, Aug. 2001.
- ARAÚJO, R. de C. Z. **Embalagens ativas com ervas aromáticas e condimentares na conservação de pães artesanais**. 2005. 88 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.
- BARRY, A. L.; THORNSBERRY, C. Susceptibility tests: diffusion test procedures. In: BALOWS, A. et al. **Manual of clinical microbiology**. 5. ed. Washington: American Society for Microbiology, 1991. p. 1117-1125.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em saúde. **Análise epidemiológica dos surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil**. Brasília, 2008.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, n. 3, p. 223-253, Aug. 2004.
- CARDOSO, M. G. et al. **Fitoquímica e química de produtos naturais**. Lavras: UFLA, 2001. 67 p. (Textos Acadêmicos).
- CRAVEIRO, A. A. et al. **Óleos essenciais de plantas do nordeste**. Fortaleza: UFC, 1981. 210 p.
- DELESPAUL, Q. et al. The antifungal activity of essential oils as determined by different screening methods. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 12, p. 256-266, Mar. 2000.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 88, n. 2, p. 308-316, Feb. 2000.

DUARTE, M. C. T. et al. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of Ethnopharmacology**, Lousanne, v. 111, n. 2, p. 197-201, May. 2007.

DZAMIC, A. et al. Chemical composition and antifungal activity of *Illicium verum* and *Eugenia caryophyllata* essential oils. **Chemistry of Natural Compounds**, New York, v. 45, n. 2, p. 259-261, Mar. 2009.

EL-HAG, E. A.; EL-NADI, A. H.; ZAITOON, A. A. Toxic and growth retarding effects of three plant extracts on *Culex pipiens* larvae (Diptera: Culicidae). **Phytotherapy Research**, London, v. 13, n. 5, p. 388-392, Aug. 1999.

FAZOLIN, M. et al. Propriedade inseticida dos óleos essenciais de *Piper hispidinervum* dc.; *Piper aduncum* l. e *Tanaecium nocturnum* (barb. rodr.) bur. & k. shum sobre *tenebrio molitor* l., 1758(1). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 1, p. 113-120, jan./fev. 2007.

FERREIRA, D. F. **SISVAR**: sistema de análise de variância, versão 4.3. Lavras: UFLA, 2003.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374-470, mar./abr. 2007.

GONÇALVES, M. E. C. et al. Extratos aquosos de plantas e o comportamento do ácaro verde da mandioca. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 58, n. 3, p. 475-479, jul./set. 2001.

GOTTLIEB, O. R. et al. Óleos essenciais da Amazônia VII. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 11, n. 1, p. 143-148, jan. 1981.

GUERRINI, A. et al. Bioactivities of *Piper aduncum* L. and *Piper obliquum* Ruiz & Pavon (Piperaceae) essential oils from Eastern Ecuador. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 27, n. 1, p. 39-48, Jan. 2009.

GUIMARÃES, L. G. L. et al. Influência da luz e da temperatura sobre a oxidação do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf). **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 6, p. 1476-1480, 2008.

HOFFMANN, F. L. et al. Determinação da atividade antimicrobiana "in vitro" de quatro óleos essenciais de condimentos e especiarias. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 17, n. 1, p. 11-20, jan./jun. 1999.

KARAMAN, İ. et al. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. **Journal of Ethnopharmacology**, Lousanne, v. 85, n. 1/2, p. 231-235, Apr. 2003.

KOTZEKIDOU, P.; GIANNAKIDIS, P.; BOULMATIS, A. Antimicrobial activity of some plant extracts and essential oil against foodborn pathogens in vitro and on the fate of inoculated pathogens in chocolate. **Food Science and Technology**, London, v. 41, n. 1, p. 119-127, Jan. 2007.

LIMA, R. K. et al. Atividade inseticida do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) sobre lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). **Acta Amazonica**, Manaus, v. 39, n. 2, p. 377-382, 2009.

MAIA, J. G. S. et al. Constituintes of the essential oil of *Piper aduncum* L. growing in the Amazon Region. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 13, n. 4, p. 269-272, July/Ago. 1998.

MAZZAFERA, P. Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-índia e eugenol. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 231-238, jun. 2003.

MIRANDA, E. M. Caracterização e avaliação produtiva de uma população nativa de pimenta longa (*Piper hispidinervum*) no Seringal Cachoeira, AC, Brasil. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 32, n. 1, p. 9-20, 2002.

MOTA, M. G. C. et al. Coleta de germoplasma e distribuição geográfica de *Piper aduncum* L. na Amazônia Brasileira. In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS DA AMÉRICA LATINA E CARIBE, 3., 2001, Londrina. **Resumos...** Londrina: Embrapa, 2001. 1 CD-ROM.

NASCIMENTO, F. R. et al. Efeito do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC) e do emulsificante Tween® 80 sobre o crescimento micelial de *Alternaria alternata* (Fungi: Hyphomycetes). **Acta Amazônica**, Manaus, v. 38, n. 3, p. 503-508, 2008.

NASCIMENTO, G. G. F. et al. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 31, n. 2, p. 247-256, Abr. 2000.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**: approved standard. 6. ed. Wayne, 2003. (NCCLS Document M7-A6; NCCLS, 940)

NAVICKIENE, H. M. D. et al. Composition and antifungal activity of essential oils from *Piper aduncum*, *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 3, p. 467-470, maio/jun. 2006.

OLIVEIRA, R. A. et al. Constituintes químicos voláteis de especiarias ricas em eugenol. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 19, n. 3, p. 771-775, jul./set. 2009.

OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 18, n. 2, p. 301-307, abr./jun. 2008.

OUSSALAH, M. et al. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, Wageningen, v. 18, n. 5, p. 414-420, May 2007.

ÖZCAN, M.; ERKMEN, O. Antimicrobial activity of the essential oils of Turkish plant spices. **European Food Research and Technology**, Heidelberg, v. 212, n. 6, p. 658-660, June 2001.

PEREIRA, A. A. et al. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 887-893, maio/jun. 2008.

PIMENTEL, F. A. et al. convenient method for the determination of moisture in aromatic plants. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 373-375, mar./abr. 2006.

RABANAL, R. M. et al. Antimicrobial studies on three species of Hypericum from the Canary Islands. **Journal of Ethnopharmacology**, Lousanne, v. 81, n. 2, p. 287-292, July 2002.

ROOBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e farmacobiotecnologia**. São Paulo: Premier, 1997. 372p.

SÁ, C. P.; PIMENTEL, F. A. **Coefficientes técnicas e avaliação financeira da cultura de Pimenta Longa no Acre**. Rio Branco: Embrapa/CPAF/AC, 2001. (Comunicado Técnico, 151).

SANTOS, L. G. M. **Avaliação do potencial fungitóxico do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr & Perry (Cravo-da-índia)**. 2005. 48 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações, 2005.

SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 35, n. 4, p. 275-280, out./dez. 2004.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Floresta**, Curitiba, v. 30, n. 1, p. 129-137, 2000.

SENTHILKUMAR, A.; KANNATHASAN, K.; VENKATESALU, V.
Antibacterial activity of the leaf essential oil of *Blumea mollis* (D. Don) Merr.
World Journal of Microbiology and Biotechnology, Amsterdam, v. 25, n. 7,
p. 1297-1300, July 2009.

SILVA, M. H. L. **Tecnologias para o desenvolvimento agro-industrial de *Piper aduncum* L.** 2004. 78p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

YUKAWA, T. A. et al. Prophylactic treatment of cytomegalovirus infection with traditional herbs. **Antiviral Research**, Leuven, v. 32, n. 2, p. 63-70, Oct. 1996.

ZACARONI, L. M. et al. Potencial fungitóxico do óleo essencial de *Piper hispidinervum* (pimenta longa) sobre os fungos fitopatogênicos *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum gloeosporioides*. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 39, n. 1, p. 193-198, mar. 2009.

**CAPÍTULO 3: Desenvolvimento e perfil de sensibilidade do antisséptico
com princípio ativo de óleo essencial de *Syzygium aromaticum* frente a
bactérias patogênicas**

RESUMO

O uso de produtos naturais em substituição às substâncias químicas sintéticas tem se tornado um desafio para a indústria de perfumaria, cosméticos, alimentos e farmacêutica. Antissépticos desenvolvidos à base de óleos essenciais têm grande potencial econômico, apresentando-se como alternativa viável no processo de assepsia. Este estudo foi realizado com o objetivo de desenvolver e avaliar o perfil de sensibilidade do antisséptico com princípio ativo de óleo essencial de *Syzygium aromaticum* frente a bactérias patogênicas *in vitro* e na redução da contaminação bacteriana natural das mãos. Na etapa *in vitro* foi verificada a ação antimicrobiana frente às bactérias *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* e *Staphylococcus aureus*. Nas mãos, a metodologia utilizada consistiu em formar três grupos com cinco pessoas cada, totalizando quinze participantes. O primeiro grupo foi submetido ao tratamento com sabão líquido sem propriedades antimicrobianas. O segundo grupo teve as mãos tratadas com antisséptico com teor alcoólico de 70% e o terceiro grupo utilizou o antisséptico elaborado com 6,3% de óleo essencial de *S. aromaticum*. Nos dados obtidos *in vitro* e na antisepsia das mãos, o antisséptico com princípio ativo de óleo essencial de *S. aromaticum* mostrou-se eficaz contra os microrganismos, nos diferentes tempos avaliados, demonstrando ser uma alternativa para a higienização das mãos, com a vantagem de ser obtido por meio de produtos naturais e, ainda, não ocasionar o ressecamento delas.

Palavras-chave: Antisséptico. *Syzygium aromaticum*. Higiene das mãos.

ABSTRACT

The use of natural products to replace the synthetic chemicals has become a challenge for the perfumery, cosmetics, food and pharmaceutical industries. Antiseptics developed based on essential oils have great economic potential, presenting itself as a viable alternative in the process of asepsis. This study aimed to develop and evaluate the sensitivity profile of the antiseptic with active principle of essential oil of *Syzygium aromaticum* against pathogenic bacteria *in vitro* and in reducing natural bacterial contamination of hands. In the *in vitro* stage, was verified antimicrobial activity against bacteria *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* and *Staphylococcus aureus*. In the hands, the adopted methodology consisted of 15 people split into three groups of five each. The first group was treated with liquid soap without antimicrobial properties. The second group had the hands treated with antiseptic with an alcohol content of 70% and the third group used the antiseptic formulated with 6.3% of essential oil of *S. aromaticum*. In the data obtained *in vitro* and in antiseptics of the hands, the antiseptic with active principle of essential oil of *S. aromaticum* was effective against the microorganisms in different evaluated time periods. Therefore, it demonstrated to be an alternative to hand hygiene with the advantage of being produced using natural products and still may not cause dryness of the hands.

Keywords: Antiseptic. *Syzygium aromaticum*. Hand hygiene.

1 INTRODUÇÃO

A crescente preocupação com o potencial de contaminação microbiana e os riscos de contaminação e infecção alimentar ocasionou um aumento do uso de desinfetantes e de antissépticos pelo público em geral (MCDONELL; RUSSELL, 1999).

As mãos são as estruturas corporais mais utilizadas no contato direto com os alimentos e constituem o principal veículo de transmissão de microrganismos patogênicos. Dessa forma, a sua antissepsia é um aspecto fundamental para a redução da microbiota e do risco de intoxicação alimentar.

O agente antisséptico é definido como uma substância antimicrobiana aplicada à pele e mucosa íntegra para reduzir a microbiota, ou seja, para efetuar a descontaminação das mãos por meio de fricção ou lavagem com esses produtos sem alterar a sua estrutura (BOYCE; PITTET, 2002). São substâncias de uso estritamente externo e devem responder ao duplo critério de eficácia e inocuidade (SÁNCHEZ-SALDAÑA; ANDUAGA, 2005).

Atualmente, encontram-se no mercado várias preparações para antissepsia das mãos, dentre elas sabão ou detergente antimicrobiano, álcool, clorexidina, iodo, compostos de quaternário de amônio e triclosan (Kawagoe, 2004). O álcool está entre os antissépticos mais seguros, não só por possuir baixíssima toxicidade, mas também pelo seu efeito microbicida rápido e de fácil aplicação (SANTOS et al., 2002).

Muitas indústrias pesquisam continuamente os óleos essenciais como fontes alternativas de antimicrobianos, mais naturais e menos nocivos ao meio ambiente. A toxicidade apresentada pelos óleos essenciais sobre alguns microrganismos pode ser devido à alta complexidade de sua fórmula química. Os grupamentos alcoois, fenóis, ésteres, ácidos, aldeídos e terpenos podem

explicar sua ação bacteriostática e ou bactericida (NOVACOSK; TORRES, 2006).

O óleo de *Syzygium aromaticum* possui ação antisséptica, expectorante e estimulante estomacal. É utilizado para diminuir a sensibilidade da polpa dentária, tendo sido muito utilizado em odontologia como analgésico. Também é um excelente reidratante para a pele, principalmente no verão (GRAMOLELLI Júnior et al., 2006).

Alguns trabalhos mostraram que eugenol conferido por um composto fenólico volátil ou extratos de *Syzygium aromaticum* apresenta atividade bactericida, dessa forma podendo ser empregado como antisséptico (DORMAN; DEANS, 2000, NASCIMENTO et al., 2000, NOVACOSK; TORRES, 2006).

A utilização do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* como matéria-prima na formulação de antissépticos é pouco explorada no Brasil. Dessa forma, este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar o perfil de sensibilidade do antisséptico com princípio ativo de óleo essencial de *Syzygium aromaticum* frente a bactérias patogênicas *in vitro* e na redução da contaminação bacteriana natural das mãos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Elaboração do gel neutro e do antisséptico

A elaboração do gel neutro foi realizada na Farmácia Escola Verde Vida, do Centro Universitário de Lavras, em Lavras, MG.

Para a obtenção do gel neutro (base) foi utilizado carbopol (1%), propilenoglicol (5%), metilparabeno (0,1%), aminometilpropanol-AMP 95 (0,5%) e água destilada. Inicialmente, o metilparabeno foi dissolvido em 462 mL de água destilada. Posteriormente, colocou-se em um béquer o carbopol, o propilenoglicol, o metilparabeno e 231 mL de água destilada, que foi homogeneizada com o auxílio de um batedor Mix Walita (tipo RI1364/RI1362). Após a completa homogeneização dos componentes, acrescentaram-se 231 mL de água destilada e, novamente, a solução foi submetida ao Mix. A mistura permaneceu em repouso por 24 horas. Após este período, adicionou-se o aminometilpropanol (AMP 95), que foi homogeneizado até a formação do gel. O produto final teve o pH ajustado em pH=6,0. Na elaboração do antisséptico foi adicionado ao gel neutro 6,3% do óleo essencial de *S. aromaticum*.

2.2 Avaliação do perfil de sensibilidade do antisséptico com princípio ativo de óleo essencial de *Syzygium aromaticum* frente a bactérias patogênicas *in vitro*

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG.

Foi realizada avaliação do perfil de sensibilidade do antisséptico com princípio ativo de óleo essencial de *Syzygium aromaticum*, *in vitro*, em seis espécies de bactérias: *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, *Escherichia coli*

ATCC 8739, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Salmonella typhi* ATCC 6539 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. As bactérias foram mantidas no freezer, em meio de congelamento, com posterior reativação em caldo BHI (caldo-infusão de cérebro e coração), com incubação 37°C, durante 24 horas.

Para padronizar a concentração de células para o teste de sensibilidade, foi utilizada uma solução padrão McFarland de 0,5, resultando numa suspensão contendo aproximadamente de 1 a 2×10^8 UFC/mL. A densidade correta do controle de turbidez foi verificada usando um espectrofotômetro (Shimadzu UV-160 1 PC), no comprimento de onda de 625 nm, em que a absorbância situou-se entre 0,08 a 0,10, como recomendado por National Committee for Clinical Laboratory Standards - NCCLS (2003).

Como neutralizante do princípio ativo do antisséptico desenvolvido foi utilizada uma solução estéril de Tween 80 (3%), saponina (3%), histidina (0,1%) e cisteína (0,1%) (BOUAZIZ et al., 2009).

Uma alíquota de 100 µL, correspondente a 1×10^8 , foi transferida para 900 µL do antisséptico e incubadas imediatamente, a 37°C. O tempo de contato avaliado foi de 5 e de 15 minutos. Após o período de incubação, 100 µL desta suspensão foram inoculados em 900 µL da solução neutralizante. Deixou-se em repouso por 2 minutos e, posteriormente, foi realizado o plaqueamento em superfície e incubação por 24 horas, a 37°C. Para as culturas de *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella typhi* ATCC 6539 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, foi utilizado o ágar Miller Hinton, *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 em ágar Tripte Soy Agar (TSA), *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 TSA-YA. O experimento foi realizado com três repetições e o resultado expresso em UFC/mL. Para o teste controle foi utilizada a base do antisséptico sem o princípio ativo.

2.3 Avaliação da eficiência do antisséptico com princípio ativo de óleo essencial de *Syzygium aromaticum* na redução da contaminação bacteriana natural das mãos

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG.

Foram utilizadas duas formulações comerciais (Tratamentos 1 e 2) e uma formulação elaborada (Tratamento 3). O tratamento 1 foi um sabão líquido sem propriedades antimicrobianas, constituído de tensoativos aniônicos (detergente doméstico). O tratamento 2 foi um antisséptico comercial alcoólico em gel com princípio ativo de etanol 70%. O terceiro tratamento foi com antisséptico com princípio ativo de óleo essencial de *S. aromaticum* (cravo-da-índia).

Foi realizada a análise da mão antes da higienização denominando-a amostra controle e, depois da higienização, como Tratamento 1 (sabão líquido), Tratamento 2 (antisséptico alcoólico) e Tratamento 3 (antisséptico com óleo essencial de cravo).

A metodologia utilizada consistiu em formar três grupos com cinco pessoas cada, totalizando quinze participantes. Considerando que os sujeitos da pesquisa eram voluntários adultos, hígidos, sem lesão e ou ressecamento de pele. O primeiro grupo foi submetido ao tratamento com sabão líquido sem propriedades antimicrobianas. O segundo grupo teve as mãos tratadas com antisséptico com teor alcoólico de 70% e o terceiro grupo utilizou o antisséptico elaborado com óleo essencial de *S. aromaticum*.

Para delimitar a área da palma da mão, controle e tratamento, foi utilizado um molde estéril de 30 cm². No momento da coleta, foram utilizados swabs estéreis que, depois de umedecidos em água peptonada 0,1%, foram friccionados de forma angular, com movimentos giratórios, conforme Litz et al.

(2007), na área palmar delimitada.

Tomou-se a mão direita para amostragem da pele antes da higienização, denominando-a amostra controle. Na mão controle, um swab, previamente umedecido em solução estéril de água peptonada 0,1%, foi friccionado na área delimitada por um minuto e colocado em 5 mL de solução estéril de água peptonada 0,1% para a contagem em placa. Para os dois antissépticos foram aplicados 1 mL na área palmar, friccionando-se por 1 minuto. Após um minuto da aplicação do gel antisséptico, um swab umedecido em solução estéril de água peptonada 0,1% foi friccionado por 1 minuto na área tratada e submetido à contagem em placas. Posteriormente, fez-se a higienização das mãos com 1 mL da formulação de sabão líquido comercial, esfregando-as por 30 segundos e enxaguando-as com 200 mL de água destilada estéril, sem secar, de acordo com Martins e Soares (1993).

Tanto para a amostra controle quanto para os tratamentos, o plaqueamento foi realizado com duas repetições pelo método de plaqueamento em superfície e incubação por 24 horas a 37°C. A avaliação foi feita visualmente após o período de incubação, contando-se o número de colônias. Para calcular o número significativo de unidades formadoras de colônia/cm² (UFC/cm²), foi utilizada a equação proposta por Silva et al. (2007):

$$\text{UFC/cm}^2 = \text{UFC/mL da suspensão} \times \left(\frac{\text{área amostrada (cm}^2\text{)}}{\text{volume diluente (mL)}} \right)$$

2.4 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. O programa estatístico empregado foi o Sisvar (FERREIRA, 2003).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Perfil de sensibilidade do antisséptico com princípio ativo de óleo essencial de *S. aromaticum* frente aos microrganismos patogênicos

De acordo com os resultados mostrados na Tabela 6, foi observado que a base utilizada para a elaboração do antisséptico não apresentou ação antimicrobiana frente aos microrganismos testados. As contagens iniciais dos microrganismos variaram de $1,1 \times 10^8$ a $2,4 \times 10^8$. Os resultados absolutos da tabela demonstram que as contagens de microrganismos foram reduzidas após 5 e 15 minutos de contato com os microrganismos, em $8,2 \log_{10}$ ou $1,55 \times 10^8$, após o tratamento com antisséptico com princípio ativo de óleo de *S. aromaticum*.

Tabela 6 Perfil de sensibilidade do antisséptico com princípio ativo de óleo essencial de *S. aromaticum* frente aos microrganismos patogênicos, nos tempos de 5 e 15 minutos.

Microrganismo	Composto			
	Base		Antisséptico	
	5 min.	15 min.	5 min.	15 min.
<i>Aeromonas hydrophila</i>	$1,6 \times 10^8$	$>1,6 \times 10^8$	-	-
<i>Escherichia coli</i>	$1,6 \times 10^8$	$>1,6 \times 10^8$	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	$2,4 \times 10^8$	$>2,4 \times 10^8$	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$1,1 \times 10^8$	$>1,1 \times 10^8$	-	-
<i>Salmonella typhi</i>	$1,3 \times 10^8$	$>1,3 \times 10^8$	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	$1,3 \times 10^8$	$>1,3 \times 10^8$	-	-

(-) Composto eficaz no tempo indicado: ausência de crescimento microbiano.
 (>) Composto não eficaz no tempo indicado: presença incontável de crescimento microbiano.

Na Figura 1 (A e B) está ilustrada a eficácia do antisséptico com princípio ativo de óleo essencial de *S. aromaticum*, frente à bactéria *Escherichia coli*.

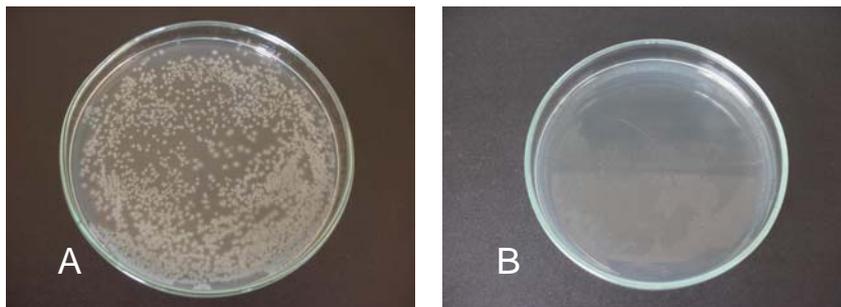


Figura 12 A) *Escherichia coli* em meio Miller Hinton; B) ausência de crescimento de *E. coli* frente ao antisséptico com princípio ativo de óleo essencial de *Syzygium aromaticum*.

3.2 Perfil de sensibilidade do antisséptico com princípio ativo de óleo essencial de *S. aromaticum* na redução da contaminação bacteriana natural das mãos

Na Tabela 2 são apresentadas as médias da contagem de colônias em placas por cm^2 da palma da mão, antes e após a higienização com os produtos em estudo. Analisando os resultados obtidos na Tabela 2, observa-se que o número de unidades formadoras de colônia por cm^2 nas mãos controle apresentou ampla variação, com valores de 150 a 4.300 UFC. A média encontrada foi de 1.149 UFC/ cm^2 . A pele saudável é colonizada por microrganismos em quantidades que variam de 100 a 10^6 UFC/ cm^2 (REDIERS et al., 2008). A contagem de microrganismo nas mãos dos indivíduos testados neste estudo está de acordo com a de uma pele saudável.

Tabela 7 Unidades formadoras de colônia por cm² da palma das mãos, antes e após a higienização.

Tratamento	Contagem total (UFC/cm ²)	
	Controle	Após
Sabão líquido (Tratamento 1)	1,5x10 ²	1,3x10 ²
	4,3x10 ³	9,0x10 ²
	1,2x10 ³	1,2x10 ³
	7,8x10 ²	2,0x10 ²
	2,0x10 ³	6,0x10 ²
Antisséptico alcoólico (Tratamento 2)	6,6x10 ²	< 1
	1,6x10 ²	< 1
	6,3x10 ²	< 1
	2,0x10 ²	< 1
	1,5x10 ³	< 1
Antisséptico com óleo essencial (Tratamento 3)	2,4x10 ²	< 1
	2,8x10 ³	< 1
	4,6x10 ²	< 1
	2,0x10 ³	< 1
	1,6x10 ²	< 1

Controle: amostra da mão direita dos indivíduos antes da higienização; Tratamento 1: amostra da mão esquerda dos indivíduos após a higienização com sabão líquido; Tratamento 2: amostra da mão esquerda dos indivíduos após a higienização com antisséptico alcoólico; Tratamento 3: amostra da mão esquerda dos indivíduos após higienização com antisséptico com princípio ativo de óleo essencial de *S. aromaticum*.

Os resultados demonstram que as contagens de microrganismos foram reduzidas na sua totalidade após o tratamento com os antissépticos (Tabela 2). Para a contagem após a utilização de sabão líquido, a redução foi menos evidente. Também se pode verificar que, nas mãos tratadas com antissépticos, a redução da contaminação bacteriana foi independente da concentração inicial de bactérias, que foi compreendida entre $1,6 \times 10^2$ a $2,8 \times 10^3$ UFC/cm².

De modo geral, constatou-se que o tratamento com sabão líquido sem propriedade antimicrobiana demonstrou redução da carga bacteriana. Esses dados podem ser considerados coerentes, pois, segundo Rottee (1996), a atividade de limpeza de sabões pode ser atribuída à sua propriedade surfactante,

favorecendo a remoção da sujeira, de substâncias orgânicas e da microbiota transitória das mãos pela ação mecânica. Se o procedimento de lavar as mãos for realizado por um período de 30 segundos, a redução bacteriana da pele é em torno de 1,8 a 2,8 \log_{10} . O desempenho do sabão não-antimicrobiano utilizado no presente estudo apresentou valores inferiores e superiores, uma vez que, em um dos voluntários, não ocorreu redução na carga microbiana e o maior valor encontrado foi de 3,5 \log_{10} .

Estudos têm documentado a atividade antimicrobiana *in vivo* dos álcoois e, efetivamente, apresentam redução na contagem bacteriana de mãos (MARTINS; SOARES, 1993; Santos, et al., 2002; Kawagoe, 2004). Normalmente, a redução logarítmica de mãos artificialmente contaminadas por bactérias-teste é, em média, de 4,0 a 5,0 \log_{10} , após 1 minuto de aplicação (BOYCE; PITTET, 2002). Neste estudo, o valor encontrado foi inferior ao mencionado, uma vez que a redução apresentada foi de 2,8 \log_{10} . Mas, a redução de valores de tal grandeza pode não ter sido possível, pois o maior valor encontrado antes da higienização foi de $1,5 \times 10^3$ UFC/cm² ou 3,2 \log_{10} (Tabela 2), sendo, contudo, importante ressaltar que o antisséptico alcoólico eliminou a carga microbiana encontrada.

Ehrenkranz e Alfonso (1991) afirmam que, quando comparada à lavagem simples com água e sabão, a aplicação de soluções alcoólicas para a higienização das mãos oferece vantagens, como rapidez de aplicação, redução do tempo de higienização e maior efeito microbicida. Estes dados se assemelham aos encontrados neste estudo, uma vez que o antisséptico alcoólico apresentou efeito bactericida superior ao da lavagem simples com água e sabão.

A atividade antimicrobiana dos álcoois tem sido atribuída à capacidade de desnaturar proteínas. Soluções alcoólicas contendo de 60% a 90% de álcool são mais potentes e concentrações mais altas são menos efetivas porque as

proteínas não são fáceis de desnaturar na ausência de água (BOYCE; PITTET, 2002). Porém, o uso frequente de soluções alcoólicas nas mãos pode causar ressecamento (KAWAGOE, 2004).

O óleo essencial de *S.aromaticum* tem propriedades antimicrobianas excelentes. Dentre os seus componentes com atividade contra microrganismos, destaca-se o eugenol, muito usado na odontologia como componente de seladores e outros produtos antissépticos de higiene bucal, tendo efeito bactericida comprovado (SHAPIRO et al., 1994; CAI; WU, 1996, KAPLAN et al., 1999). A ação antisséptica do óleo essencial de *S. aromaticum* apresentou redução de 3,0 log₁₀, valor superior ao encontrado para o álcool 70%. Esta eficiência pode, em parte, ser atribuída à ação hidratante do óleo, pois os princípios ativos podem continuar atuando com ação surfactante. Essa ação antimicrobiana pode ser justificada pelo fato de os óleos essenciais serem capazes de agir atuando principalmente nas proteínas de membrana, ocasionando a liberação do conteúdo celular (LAMBERT et al., 2001).

O eugenol, principal constituinte químico do óleo essencial de *S. aromaticum*, exibe comprovadas atividades como antibacteriano, antimicótico, antimicrobiano, anti-inflamatório, anestésico, antisséptico, antioxidante, alelopático e repelente (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

A comparação das médias de redução percentuais da contagem total após a higienização das mãos com sabão líquido, antisséptico alcoólico e antisséptico com princípio ativo de óleo essencial de *S. aromaticum* está demonstrada na Tabela 3.

Tabela 8 Médias de reduções percentuais da contagem total após a higienização das mãos com sabão líquido, antisséptico alcoólico e antisséptico com princípio ativo de óleo essencial de *S. aromaticum*.

Tratamentos	Redução (%) Média ⁽¹⁾
Antisséptico alcoólico (Tratamento 2)	100,0a
Antisséptico com óleo essencial (Tratamento 3)	100,0a
Sabão líquido (Tratamento 1)	47,4b

⁽¹⁾ a, b: médias seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente, pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

No teste com sabão líquido neutro, verificou-se redução média de 47,4%, em 30 segundos de tratamento. Este resultado difere do encontrado por Silva et al. (1991) que determinaram uma redução superior a 90% sobre a flora microbiana das mãos com o uso do sabão neutro, por 15 segundos.

Apesar de o sabão ser um produto destinado à higiene corporal ou das mãos, alguns estudos relatam um aumento da colonização bacteriana das mãos (BRESOLIN et al., 2005; BOYCE; PITTET, 2002; LARSON, 1995), sugerindo contaminação microbiana durante o processo de higienização.

O antisséptico com princípio ativo de óleo essencial de *S. aromaticum* e o alcoólico, após cinco minutos de aplicação, não demonstrou diferença estatística entre eles ($p < 0,05$), no que diz respeito à redução da contagem de microrganismos após a sua aplicação, evidenciando a potencialidade do composto vegetal, como agente antimicrobiano.

A partir dos resultados obtidos, fica clara a necessidade da aplicação do procedimento duplo de higienização das mãos que consiste, resumidamente, em limpeza com sabão, seguida de enxágue e aplicação de antisséptico, uma vez que a lavagem das mãos com sabão não-antimicrobiano falhou em remover completamente os patógenos das mãos.

O perfil de sensibilidade do antisséptico com princípio ativo de óleo essencial de *S. aromaticum* apresentou resultado semelhante, quando comparado ao antisséptico alcoólico, o que permite afirmar que esse princípio ativo apresentou alta eficiência bactericida. Esses resultados são importantes, uma vez que, para a elaboração do antisséptico, foram utilizados recursos renováveis que não agridem o meio ambiente, pois exploram somente os botões florais, sem a destruição da planta, além de agregar valores aos subprodutos vegetais. Dessa forma, antissépticos desenvolvidos à base de produtos naturais possuem grande potencial para exploração econômica, tornando-se uma alternativa viável no processo de antisepsia.

Uma vez que a eficiência do antisséptico com princípio ativo de óleo essencial de *S. aromaticum* foi comparada à eficiência do álcool 70%, pode-se dizer que essa proposta é inovadora, pois contribuiu para o desenvolvimento de um produto que visa o bem-estar da saúde humana, em substituição aos já existentes, que colocam em riscos a saúde da população, promovem a seleção de microrganismos resistentes e ocasionam impactos ambientais.

Mediante esta constatação, sugere-se a continuidade de estudos que relacionem a viabilidade econômica e o uso desse óleo na elaboração de produtos destinados à higiene pessoal, em especial das mãos.

4 CONCLUSÃO

Na avaliação *in vitro*, o antisséptico com princípio ativo de óleo essencial de *S. aromaticum* demonstrou eficiência contra as bactérias *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* e *Staphylococcus aureus*, após 5 e 15 minutos de aplicação.

O antisséptico com princípio ativo de óleo essencial de *S. aromaticum* reduziu 3,2 \log_{10} de microrganismos naturalmente encontrados nas mãos de adultos saudáveis.

O antisséptico com princípio ativo de óleo essencial de *S. aromaticum* apresentou vantagens, em comparação com o álcool 70%, dentre elas a hidratação das mãos e a utilização de recursos renováveis que não agredem o meio ambiente.

Antissépticos desenvolvidos à base de óleos essenciais com propriedades antimicrobianas têm grande potencial para exploração econômica, tornando-se uma alternativa viável na elaboração de produtos de higiene pessoal e na prevenção da contaminação de alimentos.

REFERÊNCIAS

BOUAZIZ, M. et al. Desinfectant properties of essential oils from *Salvia officinalis* L. cultivated in Tunisia. **Food and Chemical Toxicology**, London, v. 47, n. 11, p. 2755-2760, Nov. 2009.

BOYCE, J. M.; PITTET, D. Guideline for hand hygiene in health-care settings: recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee and HICPAC/SHEA/ APIC/IDSA. **MMWR: recommendations and reports, morbidity and mortality weekly report, Recommendations and reports**, Atlanta, v. 51, n. RR16, p. 1-45, Out. 2002.

BRESOLIN, B. M. Z. et al. Pesquisa sobre a bactéria *Staphylococcus aureus* na mucosa nasal e mãos de manipuladores. **Estudos de Biologia**, Curitiba, v. 27, n. 59, p.27-32, abr./jun. 2005.

CAI, L. N.; WU, C. D. Compounds from *Syzygium aromaticum* possessing growth inhibitory activity against oral pathogens. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 59, n. 10, p. 987-990, Oct. 1996.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 88, n. 2, p. 308-316, Feb. 2000.

EHRENKRANZ, N. J.; ALFONSO, B. C. Failure of bland soap handwash to prevent hand transfer of patient bacteria to urethral catheters. **Infection control and hospital epidemiology**, Chicago, v. 12, n. 11, p. 654-662, Nov. 1991.

FERREIRA, D. F. **SISVAR**: sistema de análise de variância, versão 4.3. Lavras: UFLA, 2003.

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

GRAMOLELLI JUNIOR, F. G. et al. Extração de óleos essenciais e verificação da atividade antifúngica. **Argumento**, Jundiaí, v. 8, n. 14, p. 49-65, maio 2006.

KAPLAN, A. E. et al. Antimicrobial effect of six endodontic sealers: an in vitro evaluation. **Dental Traumatology**, Copenhagen, v. 15, n. 1, p. 42-45, Aug. 1999.

KAWAGOE, J. Y. **Higiene das mãos: comparação da eficácia antimicrobiana do álcool - formulação gel e líquida - nas mãos com matéria orgânica.** 2004. 122p. Tese (Doutorado em Enfermagem na Saúde do Adulto) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

LAMBERT, R. J. W. et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, n. 3, p. 453-462, Sept. 2001.

LARSON, E. L. APIC guideline for hand washing and hand antisepsis in health-care settings. **American Journal of Infection Control**, Washington, v. 23, n. 4, p. 251-269, Aug. 1995.

LITZ, V. M. et al. Anti-sepsia de mãos na indústria de carnes: avaliação da clorexidina, triclosan e iodóforo na redução da contaminação microbiana em manipuladores. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 35, n. 3, p. 321-326, 2007.

MARTINS, S. C. S.; SOARES, J. B. Avaliação da eficiência de antissépticos na limpeza das mãos. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 11, n. 1, p. 65-70, jan./jun. 1993.

MCDONELL, G.; RUSSELL, A. D. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 12, n. 1, p. 147-79, Jan. 1999.

NASCIMENTO, G. G. F. et al. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 31, n. 2, p. 247-256, abr. 2000.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard.** 6. ed. Wayne, 2003. (NCCLS Document M7-A6; NCCLS, 940)

NOVACOSK, R.; TORRES, R. S. L. de A. Atividade antimicrobiana sinérgica entre óleos essenciais de lavanda (*Lavandula officinalis*), melaleuca (*Melaleuca alternifolia*), cedro (*Juniperus virginiana*), tomilho (*Thymus vulgaris*) e cravo (*Eugenia caryophyllata*). **Analytica**, São Paulo, n. 21, p. 32-39, fev/mar. 2006.

REDIERS, H. et al. Hand hygiene in the food industry: Resolving an enigma?. **Food protection Trends**, Des Moines, v. 28, n. 8, p. 568-584, Aug. 2008.

ROTTER, M. L. Hand washing and hand disinfection. In: MAYHALL, G. (Ed.). **Hospital epidemiology and infection control**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996. p. 1052-1068.

SANCHEZ-SALDANA, L.; ANDUAGA, E. S. Antisépticos y desinfectantes. **Dermatologia peruana**, Lima, v. 15, n. 2, p. 83-103, maio/ago. 2005.

SANTOS, A. A. M. et al. Importância do álcool no controle de infecções em serviços de saúde. **Revista de Administração em Saúde**, São Paulo, v. 4, n. 16, p. 7-14, jul./set. 2002.

SHAPIRO, S.; MEIER, A.; GUGGENHEIM, B. The antimicrobial activity of essential oils and essential oil components towards oral bacteria. **Oral Microbiology and Immunology**, Copenhagen, v. 9, n. 4, p. 202-208, Aug. 1994.

SILVA, M. G. et al. Comparação do sabão neutro e o álcool a 70% na lavagem higiênica das mãos. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 22, n. 3, p. 159, set. 1991.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2007. 544p.

APÊNDICES

APÊNDICES

Tabela 1 Média dos resultados dos halos de inibição dos óleos essenciais de *Piper aduncum*, *Piper hispidinervum* e *Syzygium aromaticum* sobre *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966

Tabela 2 Média dos resultados dos halos de inibição dos óleos essenciais de *Piper aduncum*, *Piper hispidinervum* e *Syzygium aromaticum* sobre *Escherichia coli* ATCC 8739

Tabela 3 Média dos resultados dos halos de inibição dos óleos essenciais de *Piper aduncum*, *Piper hispidinervum* e *Syzygium aromaticum* sobre *Listeria monocytogenes* ATCC 7644.

Tabela 4 Média dos resultados dos halos de inibição dos óleos essenciais de *Piper aduncum*, *Piper hispidinervum* e *Syzygium aromaticum* sobre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

Tabela 5 Média dos resultados dos halos de inibição dos óleos essenciais de *Piper aduncum*, *Piper hispidinervum* e *Syzygium aromaticum* sobre *Salmonella typhi* ATCC 6539.

Tabela 6 Média dos resultados dos halos de inibição dos óleos essenciais de *Piper aduncum*, *Piper hispidinervum* e *Syzygium aromaticum* sobre *Staphylococcus aureus* ATCC25923.

Tabela 7 Média dos resultados dos halos de inibição dos óleos essenciais de *Piper aduncum*, *Piper hispidinervum* e *Syzygium aromaticum* sobre *Aspergillus flavus*.

Tabela 8 Média dos resultados dos halos de inibição dos óleos essenciais de *Piper aduncum*, *Piper hispidinervum* e *Syzygium aromaticum* sobre *Aspergillus fumigatus*.

Tabela 9 Média dos resultados dos halos de inibição dos óleos essenciais de *Piper aduncum*, *Piper hispidinervum* e *Syzygium aromaticum* sobre *Aspergillus niger*

Tabela 10 Média dos resultados dos halos de inibição dos óleos essenciais de *Piper aduncum*, *Piper hispidinervum* e *Syzygium aromaticum* sobre *Aspergillus parasiticus*.

Tabela 11 Média dos resultados dos halos de inibição dos óleos essenciais de *Piper aduncum*, *Piper hispidinervum* e *Syzygium aromaticum* sobre *Candida albicans* ATCC 10231.

Tabela 12 Média dos resultados dos halos de inibição dos óleos essenciais de *Piper aduncum*, *Piper hispidinervum* e *Syzygium aromaticum* sobre *Cladosporium cladosporioides*.

Tabela13 Média dos resultados dos halos de inibição dos óleos essenciais de *Piper aduncum*, *Piper hispidinervum* e *Syzygium aromaticum* sobre *Penicillium brevicompactum*

Tabela 14 Média dos resultados dos halos de inibição dos óleos essenciais de *Piper aduncum*, *Piper hispidinervum* e *Syzygium aromaticum* sobre *Penicillium citrinum*

Tabela 15 Média dos resultados dos halos de inibição dos óleos essenciais de *Piper aduncum*, *Piper hispidinervum* e *Syzygium aromaticum* sobre *Penicillium solitum*.

Tabela 16 Composição química do óleo essencial das folhas frescas de *Piper aduncum*.

Tabela 17 Composição química do óleo essencial das folhas frescas de *Piper hispidinervum*.

Tabela 18 Composição química dos botões florais secos de *Syzygium aromaticum*.

Tabela 1 Média dos resultados dos halos de inibição dos óleos essenciais de *Piper aduncum*, *Piper hispidinervum* e *Syzygium aromaticum* sobre *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966

Bactéria	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Halo de inibição (mm)		
		<i>P. aduncum</i>	<i>P. hispidinervum</i>	<i>S. aromaticum</i>
<i>Aeromonas hydrophila</i>	DMSO	0 a	0 a	0 a
	3,9	0 a	0 a	0 a
	7,81	0 a	0 a	0 a
	15,62	0 a	0 a	1,7 a
	31,25	0 a	0 a	5,5 b
	62,5	0 a	0 a	14,8 c
	125	0 a	0 a	18,8 d
	250	1 b	4,0 b	19,5 de
	500	2 c	6,7 b	21,8 e
	Clorafenicol	22,3 d	21,6 c	21,8 e
CV (%)	7,2	32,0	9,0	

* Médias na mesma coluna seguidas de mesma letra são iguais entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

Tabela 2 Média dos resultados dos halos de inibição dos óleos essenciais de *Piper aduncum*, *Piper hispidinervum* e *Syzygium aromaticum* sobre *Escherichia coli* ATCC 8739

Bactéria	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Halo de inibição (mm)		
		<i>P. aduncum</i>	<i>P. hispidinervum</i>	<i>S. aromaticum</i>
<i>Escherichia coli</i>	DMSO	0 a	0 a	0 a
	3,9	0 a	0 a	0 a
	7,81	0 a	0 a	0 a
	15,62	0 a	0 a	1 a b
	31,25	0 a	0 a	2,7 b c
	62,5	0 a	0 a	3,3 b c d
	125	0 a	0 a	4,8 c d
	250	0 a	0 a	5,7 d
	500	0 a	0 a	11 e
	Clorafenicol	13,6 b	15,6 b	16,3 f
CV (%)	53,4	23,3	19,1	

* Médias na mesma coluna seguidas de mesma letra são iguais entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

Tabela 3 Média dos resultados dos halos de inibição dos óleos essenciais de *Piper aduncum*, *Piper hispidinervum* e *Syzygium aromaticum* sobre *Listeria monocytogenes* ATCC 7644.

Bactéria	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Halo de inibição (mm)		
		<i>P. aduncum</i>	<i>P. hispidinervum</i>	<i>S. aromaticum</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	DMSO	0 a	0 a	0 a
	3,9	0 a	0 a	0 a
	7,81	0 a	0 a	0 a
	15,62	0 a	0 a	0 a
	31,25	0 a	0 a	0 a
	62,5	0 a	0 a	1,3 a b
	125	0 a	0 a	2,7 b
	250	0 a	0 a	4,3 c
	500	0 a	0 a	5,7 c
	Clorafenicol	10,3 b	11 b	10 d
	CV (%)	17,6	28,7	21,0

* Médias na mesma coluna seguidas de mesma letra são iguais entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

Tabela 4 Média dos resultados dos halos de inibição dos óleos essenciais de *Piper aduncum*, *Piper hispidinervum* e *Syzygium aromaticum* sobre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

Bactéria	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Halo de inibição (mm)		
		<i>P. aduncum</i>	<i>P. hispidinervum</i>	<i>S. aromaticum</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DMSO	0 a	0 a	0 a
	3,9	0 a	0 a	0 a
	7,81	0 a	0 a	0 a
	15,62	0 a	0 a	0 a
	31,25	0 a	0 a	0 a
	62,5	0 a	0 a	2,7 b
	125	0 a	0 a	3 b
	250	0 a	0 a	4 b c
	500	0 a	0 a	5 c
	Clorafenicol	14 b	17 b	16,3 d
	CV (%)	22,59	37,2	16,69

* Médias na mesma coluna seguidas de mesma letra são iguais entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

Tabela 5 Média dos resultados dos halos de inibição dos óleos essenciais de *Piper aduncum*, *Piper hispidinervum* e *Syzygium aromaticum* sobre *Salmonella typhi* ATCC 6539.

Bactéria	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Halo de inibição (mm)		
		<i>P. aduncum</i>	<i>P. hispidinervum</i>	<i>S. aromaticum</i>
<i>Salmonella typhi</i>	DMSO	0 a	0 a	0 a
	3,9	0 a	0 a	0 a
	7,81	0 a	0 a	0 a
	15,62	0 a	0 a	0 a
	31,25	0 a	0 a	1,7 a b
	62,5	0 a	0 a	3,7 a b c
	125	0 a	0 a	4 b c
	250	0 a	0 a	5 b c
	500	0 a	0 a	7 c
	Clorafenicol	11,6 b	12,3	12,6 d
	CV (%)	41,4	14,8	38,2

* Médias na mesma coluna seguidas de mesma letra são iguais entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

Tabela 6 Média dos resultados dos halos de inibição dos óleos essenciais de *Piper aduncum*, *Piper hispidinervum* e *Syzygium aromaticum* sobre *Staphylococcus aureus* ATCC25923.

Bactéria	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Halo de inibição (mm)		
		<i>P. aduncum</i>	<i>P. hispidinervum</i>	<i>S. aromaticum</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	DMSO	0 a	0 a	0 a
	3,9	0 a	0 a	0 a
	7,81	0 a	0 a	0 a
	15,62	0 a	0 a	0 a
	31,25	0 a	0 a	0 a
	62,5	0 a	0 a	2 b
	125	0 a	0 a	3 c
	250	0 a	0 a	4,7 d
	500	1,3 b	0 a	7 e
	Clorafenicol	10,3 c	10,3 b	12,3 f
	CV (%)	34,2	35,3	8,6

* Médias na mesma coluna seguidas de mesma letra são iguais entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

Tabela 7 Média dos resultados dos halos de inibição dos óleos essenciais de *Piper aduncum*, *Piper hispidinervum* e *Syzygium aromaticum* sobre *Aspergillus flavus*.

Bactéria	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Halo de inibição (mm)		
		<i>P. aduncum</i>	<i>P. hispidinervum</i>	<i>S. aromaticum</i>
<i>Aspergillus flavus</i>	DMSO	0 a	0 a	0 a
	3,9	0 a	0 a	0 a
	7,81	0 a	0 a	0 a
	15,62	0 a	0 a	0 a
	31,25	0 a	0 a	0 a
	62,5	0 a	0 a	3,7 b
	125	0 a	0 a	7,3 c
	250	0 a	0 a	21,7 d
	500	0 a	0 a	26,7 e
	Cloreto de benzalconio	3,3 b	7 b	5 b c
	CV (%)	34,2	35,3	8,6

* Médias na mesma coluna seguidas de mesma letra são iguais entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

Tabela 8 Média dos resultados dos halos de inibição dos óleos essenciais de *Piper aduncum*, *Piper hispidinervum* e *Syzygium aromaticum* sobre *Aspergillus fumigatus*.

Bactéria	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Halo de inibição (mm)		
		<i>P. aduncum</i>	<i>P. hispidinervum</i>	<i>S. aromaticum</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	DMSO	0 a	0 a	0 a
	3,9	0 a	0 a	0 a
	7,81	0 a	0 a	0 a
	15,62	0 a	0 a	0 a
	31,25	0 a	0 a	0 a
	62,5	0 a	0 a	0 a
	125	0 a	0 a	20 c
	250	0 a	0 a	40 d
	500	3 b	3 b	45,3 e
	Cloreto de benzalconio	13,3 c	19,6 c	15 b
	CV (%)	23,2	8,0	3,6

* Médias na mesma coluna seguidas de mesma letra são iguais entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

Tabela 9 Média dos resultados dos halos de inibição dos óleos essenciais de *Piper aduncum*, *Piper hispidinervum* e *Syzygium aromaticum* sobre *Aspergillus niger*

Bactéria	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Halo de inibição (mm)		
		<i>P. aduncum</i>	<i>P. hispidinervum</i>	<i>S. aromaticum</i>
<i>Aspergillus niger</i>	DMSO	0 a	0 a	0 a
	3,9	0 a	0 a	0 a
	7,81	0 a	0 a	0 a
	15,62	0 a	0 a	0 a
	31,25	0 a	0 a	0 a
	62,5	0 a	0 a	4,7 a b
	125	0 a	0 a	8,3 b
	250	0 a	0 a	32,3 c
	500	0 a	3 b	35,7 c
	Cloreto de benzalconio	4,6 b	5 c	5 b
CV (%)		23,2	8,0	3,6

* Médias na mesma coluna seguidas de mesma letra são iguais entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

Tabela 10 Média dos resultados dos halos de inibição dos óleos essenciais de *Piper aduncum*, *Piper hispidinervum* e *Syzygium aromaticum* sobre *Aspergillus parasiticus*.

Bactéria	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Halo de inibição (mm)		
		<i>P. aduncum</i>	<i>P. hispidinervum</i>	<i>S. aromaticum</i>
<i>Aspergillus parasiticus</i>	DMSO	0 a	0 a	0 a
	3,9	0 a	0 a	0 a
	7,81	0 a	0 a	0 a
	15,62	0 a	0 a	0 a
	31,25	0 a	0 a	0 a
	62,5	0 a	0 a	0 a
	125	0 a	0 a	14 b
	250	0 a	0 a	33,7 c
	500	0 a	2 b	38,3 d
	Cloreto de benzalconio	3,3 b	4,6 c	5 a
CV (%)		54,7	27,3	12,6

* Médias na mesma coluna seguidas de mesma letra são iguais entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

Tabela 11 Média dos resultados dos halos de inibição dos óleos essenciais de *Piper aduncum*, *Piper hispidinervum* e *Syzygium aromaticum* sobre *Candida albicans* ATCC 10231.

Bactéria	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Halo de inibição (mm)		
		<i>P. aduncum</i>	<i>P. hispidinervum</i>	<i>S. aromaticum</i>
<i>Candida albicans</i>	DMSO	0 a	0 a	0 a
	3,9	0 a	0 a	0 a
	7,81	0 a	0 a	0 a
	15,62	0 a	0 a	0 a
	31,25	0 a	0 a	0 a
	62,5	0 a	0 a	0 a
	125	0 a	0 a	2,7 b
	250	0 a	0 a	4 c
	500	0 a	0 a	6 d
	Cloreto de benzalconio	11,6 b	10,6 b	11,3 e
CV (%)		15,6	17,1	10,4

* Médias na mesma coluna seguidas de mesma letra são iguais entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

Tabela 12 Média dos resultados dos halos de inibição dos óleos essenciais de *Piper aduncum*, *Piper hispidinervum* e *Syzygium aromaticum* sobre *Cladosporium cladosporioides*.

Bactéria	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Halo de inibição (mm)		
		<i>P. aduncum</i>	<i>P. hispidinervum</i>	<i>S. aromaticum</i>
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	DMSO	0 a	0 a	0 a
	3,9	0 a	0 a	0 a
	7,81	0 a	0 a	0 a
	15,62	0 a	0 a	0 a
	31,25	0 a	0 a	2,7 a
	62,5	0 a	0 a	14,7 b
	125	0 a	0 a	27,7 d
	250	0 a	2,7 b	33 d e
	500	0 a	4,3 b	36,3 e
	Cloreto de benzalconio	14,6 b	22,6 c	21 c
CV (%)		12,4	24,5	15,7

* Médias na mesma coluna seguidas de mesma letra são iguais entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

Tabela 13 Média dos resultados dos halos de inibição dos óleos essenciais de *Piper aduncum*, *Piper hispidinervum* e *Syzygium aromaticum* sobre *Penicillium brevicompactum*

Bactéria	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Halo de inibição (mm)		
		<i>P. aduncum</i>	<i>P. hispidinervum</i>	<i>S. aromaticum</i>
<i>Penicillium brevicompactum</i>	DMSO	0 a	0 a	0 a
	3,9	0 a	0 a	0 a
	7,81	0 a	0 a	0 a
	15,62	0 a	0 a	0 a
	31,25	0 a	0 a	0 a
	62,5	0 a	0 a	0 a
	125	0 a	0 a	15,3 b
	250	0 a	0 a	32,3 d
	500	4 b	0 a	37 e
	Cloreto de benzalconio	21 c	16 b	21,3 c
	CV (%)	12,6	19,7	9,1

* Médias na mesma coluna seguidas de mesma letra são iguais entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

Tabela 14 Média dos resultados dos halos de inibição dos óleos essenciais de *Piper aduncum*, *Piper hispidinervum* e *Syzygium aromaticum* sobre *Penicillium citrinum*

Bactéria	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Halo de inibição (mm)		
		<i>P. aduncum</i>	<i>P. hispidinervum</i>	<i>S. aromaticum</i>
<i>Penicillium citrinum</i>	DMSO	0 a	0 a	0 a
	3,9	0 a	0 a	0 a
	7,81	0 a	0 a	0 a
	15,62	0 a	0 a	0 a
	31,25	0 a	0 a	0 a
	62,5	0 a	0 a	3,7 b
	125	0 a	0 a	9,7 c
	250	0 a	0 a	19 d
	500	0 a	2,7 b	24,3 e
	Cloreto de benzalconio	4 b	10,6 c	4 b
	CV (%)	79,0	29,93	11,74

* Médias na mesma coluna seguidas de mesma letra são iguais entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

Tabela 15 Média dos resultados dos halos de inibição dos óleos essenciais de *Piper aduncum*, *Piper hispidinervum* e *Syzygium aromaticum* sobre *Penicillium solitum*.

Bactéria	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Halo de inibição (mm)		
		<i>P. aduncum</i>	<i>P. hispidinervum</i>	<i>S. aromaticum</i>
<i>Penicillium solitum</i>	DMSO	0 a	0 a	0 a
	3,9	0 a	0 a	0 a
	7,81	0 a	0 a	0 a
	15,62	0 a	0 a	0 a
	31,25	0 a	0 a	0 a
	62,5	0 a	0 a	2 a
	125	0 a	0 a	5 a b
	250	0 a	1 b	21,3 c
	500	0 a	2 c	29 d
	Cloreto de benzalconio	10,3 b	16 d	9 b
CV (%)		17,67	16,64	26,45

* Médias na mesma coluna seguidas de mesma letra são iguais entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

Tabela 16 Composição química do óleo essencial das folhas frescas de *Piper aduncum*.

Compostos	TR	IRRIit	IRRcal	%
1 α - pineno	5,379	939	932	0,95
2 β - pineno	6,527	979	976	1,59
3 (Z)- β - ocimeno	8,406	1037	1035	3,16
4 (E)- β - ocimeno	8,788	1050	1046	7,84
5 Cis-óxido de linalool	9,686	1072	1070	0,78
6 Trans-sabineno hidratado	10,774	1098	1102	18,79
7 NI	11,390	-	1113	1,39
8 NI	15,251	-	1208	0,63
9 safrol	18,757	1287	1289	1,07
10 2-undecanona	19,036	1292	1294	0,49
11 2-undecanol	19,393	1301	1302	0,68
12 α -gurjuneno	23,410	1409	1406	0,84
13 (E)-cariofileno	24,597	1419	1419	3,22
14 Aromadrendeno	25,430	1441	1437	0,48
15 α -humuleno	26,055	1454	1455	4,44
16 Allo-aromadrendeno	26,358	1459	1460	0,72
17 <trans->cadina-1(6),4-dieno	27,033	1476	1474	0,55

18	α -muuroleno	27,229	1479	1481	4,00
19	NI	27,430	-	1488	0,78

“Continua.”

Tabela 16 “Continuação”.

	Compostos	TR	IRRlit	IRRcal	%
20	Biciclogermacreno	27,888	1500	1495	5,26
21	γ -cadineno	28,223	1513	1512	0,58
22	δ -cadineno	28,623	1523	1518	1,15
23	Germacreno B	28,988	1561	1559	1,89
24	(E)-nerolidol	30,703	1563	1563	19,30
25	Espatulenol	31,219	1578	1577	2,67
26	Óxido de cariofileno	31,461	1583	1582	2,87
27	NI	31,797	-	1595	0,80
28	NI	32,249	-	1605	1,57
29	NI	32,472	-	1610	1,68
30	1-epi-cubenol	32,705	1628	1628	0,67
31	NI	33,009	-	1633	0,50
32	NI	33,222	-	1639	0,60
33	epi- α -cadinol	33,720	1640	1642	2,79
34	α -muurolol	33,915	1646	1647	0,76
35	NI	34,246	-	1656	2,79
36	NI	34,858	-	1671	0,77
37	NI	35,633	-	1694	0,85

TR = tempo de retenção (minutos), IRRlit = índice de retenção da literatura (Adams, 2007), IRRcal = índice de retenção calculado pela equação de Kovats, % = concentração em porcentagem. NI = não identificado

Tabela 17 Composição química do óleo essencial das folhas frescas de *Piper hispidinervum*.

	Compostos	TR	IRRlit	IRRcal	%
1	α - pineno	5,369	939	932	0,83
2	Mirceno	6,865	990	988	0,87
3	δ -3-careno	7,516	1011	1008	1,65
4	α - terpineno	8,122	1017	1016	0,84
5	Limoneno	8,389	1029	1028	0,58
6	(Z)- β - ocimeno	8,762	1037	1035	1,46
7	(E)- β - ocimeno	9,169	1050	1045	0,58
8	<i>p</i> -menta-2,4(8)-dieno	10,329	1088	1085	18,78
9	Safrol	18,981	1287	1293	73,44
10	NI	27,850	-	1495	0,97

TR = tempo de retenção (minutos), IRRlit = índice de retenção da literatura (Adams, 2007), IRRcal = índice de retenção calculado pela equação de Kovats, % = concentração em porcentagem, NI = não identificado.

Tabela 18 Composição química dos botões florais secos de *Syzygium aromaticum*.

	Compostos	TR	IRLit	IRRcal	%
1	NI	12,661	-	932	2,02
2	Eugenol	28,773	1359	1354	89,08
3	Trans-cariofileno	31,234	1419	1417	5,86
4	α -humuleno	35,802	1454	1453	2,30

TR = tempo de retenção (minutos), IRRlit = índice de retenção da literatura (Adams, 2007), IRRcal = índice de retenção calculado pela equação de Kovats, % = concentração em porcentagem, NI = não identificado