

**EFEITO INIBITÓRIO DE ÓLEOS  
ESSENCIAIS SOBRE O CRESCIMENTO DE  
BACTÉRIAS E FUNGOS**

**ALCILENE DE ABREU PEREIRA**

**2006**

**ALCILENE DE ABREU PEREIRA**

**EFEITO INIBITÓRIO DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE O  
CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS E FUNGOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação “Stricto Sensu” em Ciência dos Alimentos, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora

Profa. Dra. Maria das Graças Cardoso

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2006

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

Pereira, Alcilene de Abreu

Efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de bactérias e fungos /  
Alcilene de Abreu Pereira. – Lavras: UFLA, 2006.

58 p.: il.

Orientador: Maria das Graças Cardoso.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Óleos essenciais. 2. Bactérias. 3. Fungos. I. Universidade Federal de  
Lavras. II. Título.

CDD-641.3382  
-664.5

**ALCILENE DE ABREU PEREIRA**

**EFEITO INIBITÓRIO DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE O  
CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS E FUNGOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação “Stricto Sensu” em Ciência dos Alimentos, para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 22 de setembro de 2006

Prof. Dr. Luiz Ronaldo de Abreu UFLA

Prof. Dr. Ruy Carvalho UFLA

Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli UFLA

Profa. Dra. Adelir Aparecida Saczk UFLA

Profa. Dra. Maria das Graças Cardoso  
UFLA  
(Orientadora)

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL

À minha filha, Júlia, pela alegria e amor, que me deram  
força nos momentos difíceis...

Ao meu amor, Peter, que suportou minhas ausências e,  
de uma forma toda especial, motivou a realização desta  
conquista.

### **DEDICO**

À minha mãe, Elza, por estar sempre presente,  
Apoiando-me em todos os momentos.  
Ao meu papai Geraldo e a minha vó Marta, pelo apoio, carinho,  
amor e por serem meu exemplo de vida e alicerce.  
À minha irmã, Alessandra, e meu cunhado, Fernande, pela compreensão  
e apoio. Aos meus queridos sobrinhos, Vinícius e Bruno.

### **OFEREÇO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar energia, saúde, perseverança e força para a realização deste projeto, que há muito tempo era um sonho.

À professora Maria das Graças Cardoso, pela oportunidade e orientação. Sua compreensão, dedicação e amizade foram fundamentais. Obrigada por tudo!

Ao professor Luiz Ronaldo de Abreu, pela atenção, disposição e orientação.

A Isabel Cristina Laudares Faria Alvarenga (Bel), por ter “puxado o fio dessa meada” e acreditado em mim.

À professora Roberta Hilsdorf Piccoli, pela orientação, consideração e atenção, sempre disponibilizando o Laboratório e materiais.

Ao professor Luiz Roberto, pelos ensinamentos, orientação, e disponibilidade.

Ao professor Augusto Ramalho de Moraes, pela ajuda nas análises estatísticas.

A Eliane e a Goretti, pela amizade, compreensão e força, tão importantes durante a realização desse trabalho.

Ao meu amigo Luiz Gustavo, pelo companheirismo e por me ajudar nas horas mais difíceis, sempre apoiando-me.

À amiga Ana Paula, pela amizade e colaboração na condução do experimento.

Aos colegas de Laboratório, Jean, Fernando, Flávio, Fabiana, Fabiane, Milene, Ana Elisa, Lidiany, Luciene, Rafaela, Juliana, Priscila, Annete, Cleusa, Jorge, Reinier e Felipe, pela colaboração.

Aos alunos do Laboratório de Microbiologia. Em especial a Daiani, pela amizade e ajuda na condução do experimento. A Cristiane, pela colaboração e boa vontade.

Ao Departamento de Química, professores, secretárias e funcionários.  
Em especial à Miriam, Lílian e Liege, pela convivência.

A toda a equipe do CEC-Objetivo, grandes amigos conquistados, pela convivência e por me fazerem rir, até nos momentos mais difíceis.

Às minhas eternas amigas, Érica e Débora, por estarem sempre presentes, apoiando-me e compreendendo-me.

A Tatiane e a Cida, pela paciência, compreensão, amizade e, sobretudo, pelos carinhos e cuidados dispensados a Júlia.

Ao meu primo Gilberto, pela amizade e disponibilidade.

Ao meu amigo Robert (*in memoriam*), pela sabedoria e ensinamentos, que jamais esquecerei (como seus conselhos me ajudaram...).

Aos amigos Masson, Dolcenéia, João, Merce e Josye, pela força, amizade, confiança e apoio nos momentos mais necessários.

Ao Alexandre Mendonça, pelas dicas e boa vontade em ajudar.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Departamento de Ciência dos Alimentos, pela oportunidade concedida.

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

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
LISTA DE TABELAS .....	i
LISTA DE FIGURAS .....	ii
LISTA DE SÍMBOLOS .....	iii
RESUMO .....	iv
ABSTRACT .....	v
1 INTRODUÇÃO.....	1
2.1 Produtos de origem vegetal .....	3
2.1.1 Plantas aromáticas, condimentares e medicinais.....	3
2.2 Metabólitos secundários .....	4
2.2.1 Óleos Essenciais .....	7
2.3 Espécie <i>Syzygium aromaticum</i> (cravo-da-índia) .....	13
2.4 Espécie <i>Origanum vulgare</i> (orégano) .....	14
2.5 Espécie <i>Cymbopogon citratus</i> (capim-limão) .....	16
2.6 Contaminantes de alimentos.....	18
2.6.1. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	19
2.6.2. <i>Escherichia coli</i> .....	20
2.6.3. <i>Penicillium commune</i> .....	21
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 Material vegetal .....	23
3.2 Óleos essenciais.....	23
3.2.1 Extração.....	23

3.2.2 Identificação e quantificação dos constituintes dos óleos essenciais .....	24
3.3 Atividade Biológica dos Óleos Essenciais .....	25
3.3.1 Efeito inibitório de óleos essenciais sobre <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> . .....	25
3.3.2 Efeito inibitório de óleos essenciais sobre <i>Penicillium commune</i> ...	26
3.3.3 Análise estatística .....	27
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	28
4.1 Óleos Essenciais .....	28
4.1.1 Rendimento .....	28
4.1.2 Identificação e quantificação dos constituintes dos óleos essenciais .....	29
4.2 Atividade biológica .....	33
4.2.1 Efeito inibitório de óleos essenciais sobre <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> . .....	33
4.2.2 Efeito inibitório de óleos essenciais sobre <i>Penicillium commune</i> ...	38
5 CONCLUSÕES .....	44
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	45
ANEXOS .....	51

## LISTA DE TABELAS

		<b>Página</b>
TABELA 1	Rendimentos dos óleos essenciais de <i>Cymbopogon citratus</i> , <i>Origanum vulgare</i> e <i>Syzygium aromaticum</i> em Base Livre de Umidade (BLU).....	28
TABELA 2	Constituintes químicos do óleo essencial de capim-limão identificados pelo CG/EM – Índice de Kovat’s.....	30
TABELA 3	Constituintes químicos do óleo essencial de cravo-da-índia identificados pelo CG/EM – Índice de Kovat’s.....	31
TABELA 4	Constituintes químicos do óleo essencial de orégano identificados pelo CG/EM – Índice de Kovat’s.....	32
TABELA 5	Resultados médios do efeito inibitório de óleos essenciais sobre <i>Escherichia coli</i> submetida a diferentes concentrações.....	34
TABELA 6	Resultados médios do efeito inibitório de óleos essenciais sobre <i>Staphylococcus aureus</i> submetida a diferentes concentrações.....	35
TABELA 7	Resultados médios da avaliação do efeito sinérgico dos óleos estudados sobre a formação de halo de inibição pelas duas espécies de bactérias submetidas a diferentes concentrações.....	39
TABELA 8	Resultados médios da avaliação dos óleos estudados sobre o crescimento micelial do fungo <i>Penicillium commune</i> submetidos a diferentes concentrações.....	40
TABELA 9	Resultados médios da avaliação do efeito sinérgico dos óleos estudados sobre o crescimento micelial do fungo <i>Penicillium commune</i> submetidos à concentração de 250 mg/L.....	43

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Estrutura química do isopreno (monoterpenos e sesquiterpenos).....	09
FIGURA 2	Aspecto geral (A) e botões florais (B) do <i>Syzygium aromaticum</i> .....	13
FIGURA 3	Estrutura química do eugenol.....	14
FIGURA 4	Aspecto geral de <i>Origanum vulgare</i> . Folhas frescas (A) e secas (B).....	15
FIGURA 5	Estruturas químicas do Timol (A) e Carvacrol (B).....	16
FIGURA 6	Aspecto geral de <i>Cymbopogon citratus</i> localizada no Horto de Plantas Medicinais da UFLA.....	17
FIGURA 7	Estruturas químicas do neral (A) e do geranial (B).....	18
FIGURA 8	Tamanho dos halos de inibição de <i>Staphylococcus aureus</i> provocados pelos óleos essenciais.....	37
FIGURA 9	Tamanho dos halos de inibição de <i>Escherichia coli</i> provocados pelos óleos essenciais.....	37
FIGURA 10	Bioensaios realizados com os óleos essenciais de orégano (A) e cravo-da-índia (B) sobre o crescimento e/ou inibição micelial do fungo <i>Penicillium commune</i> ....	41
FIGURA 11	Bioensaios realizados com o sinergismo entre orégano e cravo-da-índia sobre o crescimento e/ou inibição micelial do fungo <i>Penicillium commune</i> . (A) Diferentes proporções e (B) 70% orégano e 30% cravo-da-índia.....	42

## LISTA DE SÍMBOLOS

<b>BHT</b>	Butil hidroxitolueno
<b>BHI</b>	Caldo infusão de cérebro e coração
<b>BLU</b>	Base livre de umidade
<b>BOD</b>	Demanda bioquímica de oxigênio
<b>CG/EM</b>	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa
<b>CO<sub>2</sub></b>	Gás carbônico
<b>CYA</b>	Meio de cultura Czapeck acrescido de extrato de levedura
<b>FID</b>	Detector por Ionização de Chamas
<b>ISO</b>	International Standard Organization
<b>K</b>	Potássio
<b>MIC</b>	Concentração Mínima Inibitória
<b>N</b>	Nitrogênio
<b>NaCl</b>	Cloreto de Sódio
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxigênio
<b>P</b>	Fósforo
<b>TSA</b>	Tryptic Soy Agar
<b>TSB</b>	Caldo Tryptic Soy

## RESUMO

PEREIRA, Alcilene de Abreu. **Efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de bactérias e fungos**. 2006. 58 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

A utilização de produtos naturais que substituam aditivos químicos tem sido uma opção para aqueles que procuram hábitos saudáveis e segurança alimentar. Os condimentos possuem comprovada atividade biológica sobre fungos e bactérias; por isso, sempre foram utilizados como conservantes de alimentos. Com o intuito de avaliar o efeito inibitório dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* (capim-limão), *Origanum vulgare* (orégano) e *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia), experimentos foram conduzidos, em laboratório, com as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e o fungo *Penicillium commune*, importantes patógenos e deterioradores de queijos e outros alimentos. Para quantificação e identificação dos constituintes químicos dos óleos, utilizou-se um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massa. Nos resultados dos testes *in vitro*, os óleos essenciais de *Cymbopogon citratus*, *Origanum vulgare* e *Syzygium aromaticum* promoveram efeito inibitório sobre as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*; porém o *Syzygium aromaticum* apresentou melhor formação de halo de inibição nas menores concentrações. O efeito inibitório dos óleos de *Origanum vulgare* e *Syzygium aromaticum* foi efetivo sobre o fungo *Penicillium commune*; o óleo essencial de orégano apresentou inibição total do crescimento micelial na concentração de 2000 mg/L, enquanto o óleo de cravo-da-índia inibiu com 250, 500, 1000 e 2000 mg/L, mostrando, portanto, melhores resultados quando comparados ao óleo de orégano. Para o efeito sinérgico dos óleos sobre as bactérias e fungo, não foram observadas diferenças quando comparados com o efeito individual. Foi possível verificar que os óleos possuem efeito inibitório sobre os microrganismos estudados, sendo, portanto, uma alternativa no controle microbiológico de alimentos.

---

\* Comitê Orientador: Maria das Graças Cardoso – UFLA (Orientadora) e Luiz Ronaldo de Abreu – UFLA (Co-orientador)

## ABSTRACT

PEREIRA, Alcilene de Abreu. **Inhinibitory effect of the essential oils over growth of bacteria and fungi.** 2006 58 p Dissertation (Nutriment Science Mastering Course) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.\*

The utilization of natural products which replace chemical additives has been an option for those looking for healthy habits and alimentary safety. Seasonings have proved biological activity over fungi and bacteria, therefore, they have always been used as food preservers. With the intent of evaluating the inhinibitory effect of the *Cymbopogon citratus* (lemon grass), *Origanun vulgare* (oregano) and *Syzygium aromaticum* (clove), some experiments were conducted in laboratories, with the *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* bacteria and the *Penincillium commune* fungus, important pathogenics and cheese and other foods deterioratives. For the oil chemical constitutions quantification and identification, it was used the gas chromatography attached to a mass spectrometry. In the in vitro tests results, the *Cymbopogon citratus*, *origanun vulgare* and *Syzygium aromaticum* essential oils presented antimicrobial activity over *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteria, even though, *Syzygium aromaticum* presented better formation of inhibition halo in smaller concentrations. The inhinibitory effect of the *Origanum vulgare* and *Syzygium aromaticum* oils was effective over the *Penincillium commune* fungus; the oregano oil presented total micelial growth inhibition in the 2000-mg/L concentration, whereas clove oil inhibited with 250, 500, 1000 and 2000 mg/L, therefore, showing better results when compared to oregano. For the oils synergetic effect over bacteria and fungi, no significant difference was noticed when compared with their own individual effect. It was possible to verify that the oils have inhibitory effect over the microorganisms studied, being, therefore an alternative in microbiological control of food.

---

\* Orientation Committee: Maria das Graças Cardoso – UFLA (Orientator) and Luiz Ronaldo de Abreu – UFLA (Joint Orientator).

## 1 INTRODUÇÃO

A humanidade sempre procurou conhecer as plantas e suas propriedades medicinais, aproveitando seus princípios ativos, baseando-se em descobertas casuais. Dessa forma, os óleos essenciais destacam-se por apresentarem substâncias resultantes do metabolismo secundário das plantas, liberadas no meio ambiente em quantidades variáveis.

O metabolismo dos seres vivos origina os metabólitos primários e secundários. Enquanto os primários são secretados e essenciais a todos os organismos, os secundários são produzidos apenas por alguns, em sua maioria, as plantas, e garantem a essas funções biológicas de perpetuação e defesa (Santos, R 2004).

Os óleos essenciais, extraídos dos vegetais por arraste de vapor de água ou outras técnicas, são compostos de grande importância em pesquisas, por serem potencialmente úteis no controle fitossanitário, propiciando o desenvolvimento de técnicas que procuram diminuir os efeitos negativos de oxidantes, radicais e microorganismos que causam prejuízos nas indústrias alimentícias.

A utilização de metabólitos secundários de plantas vem crescendo e conquistando o mercado e a preferência dos consumidores, por apresentarem benefícios à saúde, bem como menores impactos ao meio ambiente. Portanto, a pesquisa fitoquímica apresenta-se como um método útil, buscando técnicas analíticas e instrumentais que permitem o isolamento e elucidação de inúmeros compostos. Esses metabólitos possuem potencialidade para uso na indústria alimentícia, nas quais a possibilidade de contaminações é grande. Nesse caso, a utilização de substâncias inibitórias naturais é muito atraente.

Os alimentos podem transmitir diversos microrganismos, muitas vezes, patógenos para o homem, como as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, ou também deteriorantes, como o fungo *Penicillium commune*, causando diversos prejuízos para as indústrias.

Entre as espécies aromáticas, o *Cymbopogon citratus*, o *Origanum vulgare* e o *Syzygium aromaticum*, conhecidos popularmente por capim-limão, orégano e cravo-da-índia, respectivamente pertencentes às famílias Gramineae, Lamiaceae e Myrtaceae, apresentam inúmeras atividades biológicas, reflexos da diversidade química que possuem. Indústrias farmacêuticas e alimentares são as mais antigas exploradoras dos óleos essenciais dessas plantas, por possuírem comprovada atividade antibacteriana e antifúngica (Craveiro, 1981).

O uso de métodos que visam a reduzir ou eliminar a contaminação de alimentos por agentes patogênicos tem representado um importante avanço para as pesquisas relacionadas à saúde pública. Estima-se que milhares de pessoas tenham problemas com produtos alimentícios contaminados.

Atualmente, a preferência dos consumidores tem sido por aditivos naturais, que minimizam os riscos causados pelos conservantes químicos, os quais, muitas vezes, possuem agentes carcinogênicos. Sendo assim, os óleos essenciais encontrados em plantas medicinais, aromáticas e condimentares têm interessado as indústrias alimentícias, por apresentarem propriedades antibacterianas, antifúngicas e antioxidantes, tornando o estudo do efeito inibitório desses óleos em microrganismos uma alternativa para a redução do uso de aditivos químicos em alimentos.

Diante do exposto, com o presente trabalho, objetivou-se avaliar a composição química, o efeito inibitório e sinérgico dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* (capim-limão), *Origanum vulgare* (orégano) e *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia) sobre o crescimento dos microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Penicillium commune*.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Produtos de origem vegetal**

Os vegetais fazem parte da vida do homem desde seus primórdios como fonte de alimentos, de materiais para o vestuário, habitação, utilidades domésticas, defesa e ataque, na produção de meios de transporte, como utensílios para manifestações artísticas, culturais e religiosas e como meio restaurador de saúde. Nos dias atuais, representam uma das alternativas entre as diversas fontes de insumos necessários, tendo como principal vantagem o fato de serem uma fonte renovável e, em grande parte, controlável pelo ser humano (Schenkel et al, 2004).

#### **2.1.1 Plantas aromáticas, condimentares e medicinais**

Plantas aromáticas são aquelas que possuem aroma capaz de sensibilizar nosso olfato de modo agradável. Plantas condimentares são usadas 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 importante desde as primeiras civilizações (Furlan, 1998). Os povos do Egito, Israel e Grécia costumavam utilizar esses vegetais em vários procedimentos, tanto medicinais quanto culinários. No Brasil, o emprego de plantas aromáticas, condimentares e medicinais está presente desde antes da colonização, quando os índios já utilizavam ervas, passando pelos colonizadores e tornando-se amplamente

utilizadas na medicina caseira nas formas de chás, xaropes, entre outros (Mendonça, 2004).

Atualmente, as propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais de condimentos têm despertado interesse pela perspectiva de constituírem uma alternativa para as exigências dos consumidores quanto à utilização de aditivos naturais em alimentos (Tassou et al, 2000; Mendonça, 2004). Quando a finalidade desses óleos é inibir o crescimento microbiano, as concentrações devem ser maiores que aquelas utilizadas para realçar o sabor e o aroma dos alimentos. Para Shelef (1983), a concentração para inibir é de 1% a 5%, ao passo, para fins culinários, utilizam-se 0,5 a 1%, o que não é suficiente para inibir a atividade microbiana. Portanto, a determinação da concentração ideal que exerça, simultaneamente, efeito antimicrobiano e realçador de sabor e aroma dos alimentos é primordial para a utilização dos óleos essenciais de plantas, em substituição aos aditivos sintéticos para alimentos.

## **2.2 Metabólitos secundários**

Metabolismo é o conjunto de reações químicas que continuamente estão ocorrendo em cada célula, suprindo o organismo de energia, renovando suas moléculas e garantindo a continuidade do estado organizado (Ferreira C., 2000). A presença de enzimas específicas garante uma certa direção a essas reações, estabelecendo as rotas metabólicas. 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 as exigências fundamentais da célula (Santos, R, 2004).

Os processos metabólicos relacionados às macromoléculas (carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucléicos) apresentam um elevado

grau de similaridade entre os organismos e são denominados metabólitos primários. Vegetais, microorganismos e em menor escala, animais, entretanto, apresentam todo um arsenal metabólico (enzimas, coenzimas e organelas) capaz de produzir, transformar e acumular inúmeras outras substâncias não necessariamente relacionadas de forma direta à manutenção da vida do organismo produtor. Nesse grupo, encontram-se substâncias cuja produção e acumulação estão restritas a um número limitado de organismos, com bioquímica e metabolismo específicos e únicos, caracterizando-se como elementos de diferenciação e especialização (Santos, R 2004). Todo esse conjunto metabólico é definido como metabolismo secundário, cujos produtos, embora não necessariamente essenciais para o organismo produtor, garantem vantagens para sua sobrevivência e para a perpetuação de sua espécie em seu ecossistema (Castro et al, 2004).

Uma característica importante dos metabólitos secundários é a inserção desses em caminhos oxidativos, os quais protegem o metabolismo vegetal contra a ação do oxigênio, que causa toxidez nas plantas. O oxigênio molecular liberado passa por transformações, produzindo radicais livres que causam rompimento de cromossomos, ruptura de proteínas, polissacarídeos e ácido graxos. A captação eficiente de radicais é condição fundamental para sobrevivência e manutenção da estabilidade da célula. Estudos mostram que substâncias produzidas pelas angiospermas após um trauma provocado em suas folhas produzem dois tipos de antioxidantes: as fitoalexinas e os álcoois cinâmicos, formados pelo acoplamento oxidativo das ligninas (Castro et al., 2004).

Durante muito tempo, os metabólitos secundários foram considerados como produtos de excreção do vegetal. Atualmente, sabe-se que muitas dessas substâncias estão diretamente envolvidas nos mecanismos que permitem a adequação do produtor a seu meio, sendo reconhecidas várias funções de

substâncias pertencentes a essa classe de metabólitos, como, por exemplo, a defesa contra herbívoros e microorganismos, proteção contra raios UV, atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes, bem como sua participação em alelopatias (Santos R., 2004).

Os vegetais, em relação ao metabolismo secundário, possuem elevada capacidade biossintética, tanto em relação ao número de substâncias produzidas quanto à sua diversidade numa mesma espécie (Poser & Mentz, 2004)

Os metabólitos secundários apresentam várias atividades biológicas. Muitos são de importância comercial tanto na área farmacêutica quanto nas áreas alimentar, agrônômica e de perfumaria, entre outras. Entre os metabólitos secundários, os principais grupos de compostos encontrados com atividade biológica são os alcalóides, flavonóides, cumarinas, taninos, quinonas e óleos essenciais.

A origem de todos esses metabólitos pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais: o ácido chiquímico e o acetato. O ácido chiquímico origina os aminoácidos aromáticos, precursores da maioria dos metabólitos secundários aromáticos, considerados responsáveis pelo desenvolvimento do sabor. O álcool cinâmico, formado por esse caminho, é o constituinte aromático da canela e pimenta-da-jamaica, sendo transformado enzimaticamente em eugenol, principal aroma e elemento pungente do cravo-da-índia (Franco, 2003).

Os metabólitos secundários podem ser encontrados em sua forma livre, tornando-se agliconas ou ligados a uma ou mais unidades de açúcar, formando os heterosídeos, polissacarídeos e ácidos graxos que, apesar de serem considerados primários, exercem importantes funções como metabólitos secundários.

Dentro da química de produtos naturais, a fitoquímica realiza pesquisas nas quais vários metabólitos são isolados e elucidados quanto às suas estruturas

moleculares. A partir do século XIX, foram registrados os primeiros compostos isolados de plantas, como a morfina e a quinina, utilizadas no tratamento de certas doenças. Atualmente, grande número de compostos derivados de plantas é utilizado nas formulações de remédios e em sínteses orgânicas, funcionando como protótipos de importantes agentes terapêuticos sintéticos (Matos, 1997; Cosr; Simões et al, 2004).

Portanto, a biologia, a farmacologia, a tecnologia de alimentos e outras áreas têm se interessado em buscar informações úteis para a correta utilização desses compostos, que possuem distribuição e características químicas peculiares. Estudos mostram que determinadas plantas podem variar a concentração de óleo dentro de uma mesma espécie, influenciadas por fatores hereditários, que dizem respeito às interferências quantitativas e qualitativas, e por fatores ontogênicos, como solo, clima e microorganismos, entre outros (Cardoso, 2001b).

### **2.2.1 Óleos Essenciais**

Os óleos essenciais são produtos voláteis do metabolismo secundário de plantas aromáticas, formados em células especiais e encontrados em folhas, flores, sementes, caules e raiz.

A ISO (International Standard Organization) define óleos essenciais como os produtos obtidos de partes de plantas mediante destilação por arraste com vapor d'água, bem como os produtos obtidos por expressão dos pericarpos de frutos cítricos. De forma geral, são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas (Santos R., 2004). Também podem ser chamados de óleos voláteis, óleos etéreos ou essências, por serem de aparência oleosa à temperatura ambiente. Entretanto, sua principal característica é a volatilidade, diferindo, assim, dos óleos fixos, mistura de substâncias lipídicas, obtidos geralmente de sementes. Outra característica importante é o

aroma agradável e intenso da maioria dos óleos essenciais, os quais, são solúveis em solventes orgânicos apolares, apresentam solubilidade limitada em água, mas suficiente para aromatizar as soluções aquosas, denominadas hidrolatos (Simões et al, 2004).

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 possui índice de refração e são opticamente ativos, propriedades essas usadas na sua identificação e controle da qualidade (Simões et al, 2004; Oussalah, 2006).

Seus constituintes variam desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas e cumarinas, até compostos com enxofre. Na mistura, tais compostos apresentam-se em diferentes concentrações; normalmente, um deles é o composto majoritário, existindo outros em menores teores e alguns em baixíssimas quantidades (traços) (Simões et al, 2004).

Biologicamente, os óleos essenciais, por serem voláteis, atuam como sinais de comunicação química com o reino vegetal e armas de defesa contra o reino animal. Essa característica torna as plantas que os produzem poderosas fontes de agentes biocidas sendo largamente estudadas na agricultura por apresentarem atividades bactericidas, inseticidas e fungicidas (Saito & Scramin, 2000).

Muitas plantas são usadas com fins medicinais por conterem esses compostos voláteis, mas, em muitos casos, o próprio óleo separado da planta é usado como medicamento (Robbers, 1997). O uso de óleos essenciais em alimentos vem ganhando importância por apresentarem componentes naturais, evitando-se o uso de aditivos sintéticos, deteriorações, oxidações e o ataque de

microorganismos, apresentando eficiência nas funções antioxidantes, anti-radicais e antimicrobianas em alimentos (Sacchetti et al., 2005; Oussalah, 2006).

Quimicamente, a maioria dos óleos essenciais é constituída de derivados fenilpropanóides ou de terpenóides, preponderando esses últimos. Normalmente apresentam um composto majoritário (Cardoso, 2001a).

Os terpenóides constituem uma grande variedade de substâncias vegetais, sendo esse termo empregado para designar todas as substâncias cuja origem biossintética deriva de unidades do isopreno (2-metil-1,3-butadieno) (Figura 1). A unidade isoprênica, por sua vez, origina-se a partir do ácido mevalônico. Os esqueletos carbonados dos terpenóides são formados pela condensação de um número variável de unidades pentacarbonadas (Simões et al, 2004).

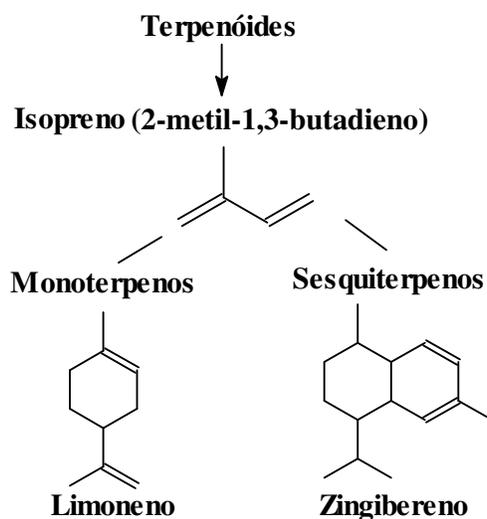


FIGURA 1 - Estrutura química do isopreno (monoterpenos e sesquiterpenos)

Os compostos terpênicos mais freqüentes nos óleos essenciais são os monoterpenos (cerca de 90% dos óleos voláteis) e os sesquiterpenos (Ikan, 1991).

Os óleos essenciais são raramente encontrados em gimnospermas (exceto coníferas). Em angiospermas monocotiledôneas, a ocorrência é relativamente rara, com exceção de gramíneas e zingiberáceas. No entanto, plantas ricas em óleos essenciais são abundantes em angiospermas dicotiledôneas, tais como nas famílias Asteraceae, Apiaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Myristicaceae, Piperaceae e Rutaceae, entre outras (Simões et al, 2004).

Dependendo da família, os óleos essenciais podem ocorrer em estruturas secretoras especializadas, tais como pêlos glandulares (Lamiaceae), células parenquimáticas diferenciadas (Lauraceae, Piperaceae, Poaceae), canais oleíferos (Apiaceae) ou em bolsas lisígenas ou esquizolisígenas (Pinaceae, Rutaceae). Os óleos essenciais podem estar estocados em certos órgãos, tais como flores (laranjeira, bergamoteira), folhas (capim-limão, eucalipto, louro) ou ainda nas cascas dos caules (canelas), madeira (sândalo, pau-rosa), raízes, rizomas (cúrcuma, gengibre), frutos (anis-estrelado, funcho, erva-doce) ou sementes (noz-moscada). Embora todos os órgãos de uma planta possam acumular óleos essenciais, sua composição pode variar segundo a localização (Robbers, 1997; Oussalah, 2006).

A composição do óleo essencial de uma planta é determinada geneticamente, sendo geralmente específica para um determinado órgão e característica para o seu estágio de desenvolvimento, mas as condições ambientais são capazes de causar variações significativas, como a influência do ciclo vegetativo, em que a concentração de cada um dos constituintes do óleo pode variar durante o desenvolvimento do vegetal. O ambiente no qual o vegetal se desenvolve e o tipo de cultivo também influem sobre a composição química

dos óleos essenciais (Williams et al., 1998). A temperatura, a umidade relativa, a duração total de exposição ao sol e o regime de ventos exercem uma influência direta, sobretudo sobre as espécies que possuem estruturas histológicas de estocagem de óleo essencial na superfície (Salgado, 2005). As plantas ricas em óleos essenciais devem ser coletadas pela manhã ou à noite, pois o período de exposição ao sol pode provocar uma perda quantitativa importante do óleo existente no vegetal. O grau de hidratação do terreno e os teores de macronutrientes (N, P, K) também podem influenciar a composição dos óleos voláteis. Entretanto, não se pode prever ou estabelecer um único padrão, pois cada espécie reage de forma diferenciada (Castro, 2006).

Oussalah et al. (2006) avaliaram a atividade bacteriana de óleos essenciais de plantas contendo eugenol, timol, carvacrol, linalol e neral nas concentrações 0,003, 0,006, 0,013, 0,025, 0,05, 0,1, 0,2, 0,4% sobre o crescimento de *E.coli* 0157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Spaphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. Os autores observaram que todos apresentaram alguma influência sobre o crescimento das bactérias nas variadas concentrações; portanto a contaminação de alimentos, apesar de ser um problema considerável para a saúde pública, pode ser controlada utilizando-se conservantes naturais.

Gayoso et al. (2005) estudaram a atividade antifúngica do óleo essencial de cravo-da-índia sobre o crescimento micelial de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. Krusei* e observaram uma concentração mínima inibitória (MIC) de 1% e 4%, atribuindo o efeito ao eugenol, componente majoritário do óleo essencial do cravo da índia.

Kulisic et al. (2004) estudaram as propriedades antioxidantes do óleo essencial de orégano; constatando que o timol e o carvacrol, componentes majoritários desse, possuem considerável efeito sobre o processo de oxidação de produtos cárneos, podendo ser comparado com o  $\alpha$ -tocoferol e o antioxidante

sintético BHT. Paralelamente, Sahin et al (2004), pesquisaram os efeitos antimicrobianos e antioxidantes desses óleos em bactérias e fungos, comprovaram a grande eficácia nos gêneros *Escherichia*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Rhizoctonia*.

Nostro et al. (2004) compararam o efeito do óleo essencial de orégano com os padrões carvacrol e timol sobre *Staphylococcus* e não encontraram diferenças significativas. Os valores de MIC (concentração mínima inibitória) observados foram 0,015-0,03% para o carvacrol, 0,03-0,06% para o timol e 0,06-0,125% para o óleo essencial de orégano.

Pyun (2005) estudou o sinergismo entre o óleo essencial de *Allium sativum* e cetoconazol, um antifúngico comercial, encontrando significativo resultado sobre fungos do gênero *Trichophyton*.

Estudos do óleo essencial de flores e folhas de *Thymus vulgaris*, que apresenta, assim como o orégano, timol e carvacrol como componentes majoritários, mostraram por meio de cromatografia gasosa grande concentração de terpenos, sesquiterpenos e hidrocarbonetos alifáticos. Esses retirados sobre diferentes partes do *Thymus vulgaris*, mostraram a presença de considerável quantidade de flavonóides e vitamina E, compostos de grande interesse na indústria alimentícia por sua atividade antioxidante (Guillén & Manzanos, 1998). O timol também foi encontrado no óleo essencial de hortelã, como grandes cristais incolores ou como pó cristalino branco. Apesar de ser um composto fenólico, é considerado terpenóide, mais especificamente um monoterpene, devido à via biossintética de que se origina. Esse composto é responsável pelas propriedades antifúngicas e antibacterianas das folhas e flores do orégano e pela aromatização de alimentos na indústria alimentícia. A gama de propriedades medicinais é variada, graças ao poder antisséptico e bactericida de seus componentes (Cardoso et al., 2001a).

### 2.3 Espécie *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia)

A espécie *Syzygium aromaticum* (Figura 2) da família Myrtaceae é uma planta arbórea, perene, e atinge 10 metros de altura. A copa é bem verde, de formato piramidal. As folhas são ovais, persistentes e de coloração verde brilhante. As flores brancas são agrupadas em inflorescências do tipo cacho e seus botões são colhidos quando sua cor muda de verde para carmim, sendo cuidadosamente dessecados ao sol. O fruto é do tipo baga e de formato alongado. Desenvolve-se em clima tropical e a propagação é feita por sementes; prefere solos ricos em matéria orgânica e nutrientes, úmidos e bem drenados.

A primeira indicação de seu uso como condimento, remédio, elemento para preparação de perfumes e incensos aromáticos veio da China. É nativa das ilhas Moluca e é conhecida no Brasil como craveiro, craveiro-da-índia e cravo (Robbers, 1997; Nagraes, 2003).



FIGURA 2 - Aspecto geral (A) e botões florais (B) do *Syzygium aromaticum*.

Seu óleo é volátil e destilado por arraste a vapor dos botões dessecados, contendo mais de 85%, por volume, de substâncias fenólicas totais, preponderando eugenol (70 a 95%), acetato de eugenila e  $\beta$ -cariofileno (Figura 3). É um líquido incolor ou amarelo-claro, classificado como aromatizante,

utilizado nos casos de dispepsia, bronquite crônica e tratamentos dentários (Robbers, 1997).

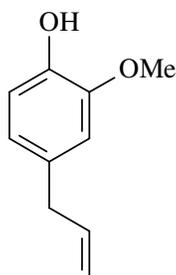


FIGURA 3 - Estrutura química do eugenol.

#### 2.4 Espécie *Origanum vulgare* (orégano)

A espécie *Origanum vulgare* (Figura 4) é uma planta perene, aromática e condimentar pertencente à família Lamiaceae e conhecida como orégão, manjerona-silvestre ou manjerona-rasteira. É uma planta herbácea, rasteira ou decumbente (Silva Júnior, 1997).

Sua altura pode oscilar entre 25 e 80 cm; o caule é ereto, às vezes com uma coloração pardo-avermelhada; forma touceiras, possui rizoma rasteiro, escuro e dele partem raízes fibrosas. As folhas são pecioladas, inteiras, opostas em ângulo reto, ovais e pontiagudas (Teske et al, 1997).

O comprimento das folhas é de 1 a 5 cm; suas flores possuem cores diversas e um comprimento de 5 a 8 mm; o fruto é tetraquênio, sendo cada uma das partes ovóide e lisa. É originária da Europa e Ásia, vegeta espontaneamente em solos pedregosos e prados da Europa e do sul da Rússia. É nativo, no México e certas regiões da América do Sul. Prefere regiões de clima temperado e solos

bem férteis de natureza calcária, permeáveis, secos, que recebam bastante luz solar (Von Hertwing, 1991; Castro, 1995).

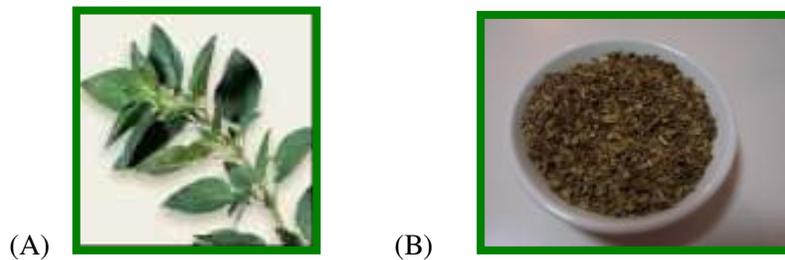


FIGURA 4 - Aspecto geral de *Origanum vulgare*. Folhas frescas (A) e secas (B).

O orégano emana um perfume fresco, intenso, herbáceo, sendo utilizado para fins aromáticos e condimentares. Seu óleo essencial é considerado como potente bactericida e fungicida reconhecido cientificamente (Castro, 2004). Anteriormente, Silva Júnior (1997), pesquisando os extratos da planta, verificou a presença de sabineno, cis- $\beta$ -ocimeno, p-cimeno e carifileno. Esses foram responsáveis pelas atividades antioxidantes, expectorantes, digestivas e antiinflamatórias associadas à planta.

Recentemente, Lee et al. (2005) encontraram no óleo essencial das folhas a presença dos componentes majoritários timol e carvacrol (Figura 5), que mostraram eficientes como antioxidantes, tanto que essa propriedade foi comparada à conhecida atividade da vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) e BHT.

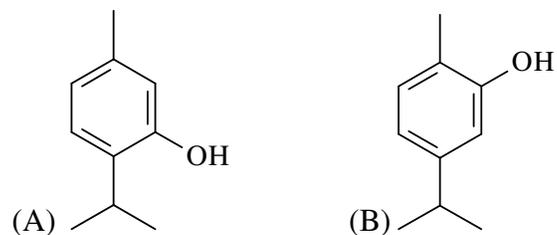


FIGURA 5 - Estruturas químicas do Timol (A) e Carvacrol (B).

### 2.5 Espécie *Cymbopogon citratus* (capim-limão)

A espécie *Cymbopogon citratus* (Figura 6) é uma planta aromática e medicinal pertencente à família Gramineae, originária da Índia. É encontrada e conhecida no Brasil como capim-cidrô, capim-cheiroso e erva-cidreira. Prefere regiões de climas quentes, possui aroma semelhante ao limão e sabor ardente. De acordo com a história, foi introduzido no Brasil no período colonial e se estendeu-se por todas as regiões, por se adaptar facilmente ao clima e se desenvolver bem em todos os tipos de solo (Silva Júnior, 1995; Teske et al, 1997; Negraes, 2003).

É uma planta herbácea, cespitosa, estolonífera, perene, que cresce cerca de 1,0 m em altura, forma touceiras de perfilhos ao nível do solo e apresentando rizomas semi-subterrâneos. As folhas são amplexicaule, linear-lanceoladas, ásperas nas duas faces, paralelinérveas, bordo liso, cortante, nervura central grossa e caniculada, são recobertas por uma fina camada de cera e apresentam textura áspera, o florescimento é raro e as flores são estéreis (Silva Júnior, 1997).



FIGURA 6 - Aspecto geral de *Cymbopogon citratus* localizada no Horto de Plantas Medicinais da UFLA.

Seu óleo essencial é rico em citral, uma mistura isomérica de geranial e neral (Figura 7) e seu conteúdo varia de 86,10 a 95,25%. Encontram-se também vários aldeídos, como citronelal, isovaleraldeído e decilaldeído; cetonas; álcoois, como geraniol, nerol, metil heptenol, farnesol e terpenos, como depenteno e mirceno. Entre os constituintes fixos da parte aérea, foram encontrados flavonóides, substâncias alcalóidicas, uma saponina esterólica,  $\beta$ -sitosterol, hexacosanol e triacontanol, triterpenóides, cimbopogonol e cimbopogona (Silva Júnior, 1997).

O citral tem efeito antiespasmódico, tanto no tecido uterino como no intestinal, atividade antibacteriana e analgésica, combate o histerismo e outras afecções nervosas. Essas propriedades terapêuticas foram atribuídas à presença do mirceno, um dos constituintes majoritários do óleo essencial da planta (Teske et al, 1997; Silva Júnior, 1997).

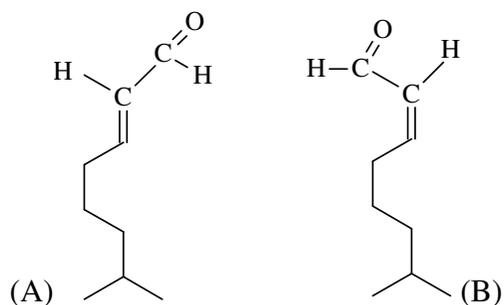


FIGURA 7 - Estruturas químicas do neral (A) e do geranial (B).

## 2.6 Contaminantes de alimentos

Os alimentos podem transmitir agentes patogênicos por microrganismos, que poderão sintetizar substâncias tóxicas, prejudiciais se ingeridas pelo homem ou animal.

Por possuírem um papel importante na economia mundial, os alimentos devem ser elaborados a partir de padrões sanitários que apresentem boa qualidade e segurança física, química e biológica. No caso das toxinfecções alimentares, o enfoque ocorre na contaminação bacteriana, uma vez que essa é a maior causa desse tipo de enfermidade (Santos A., 2004).

Para ocorrerem doenças de origem alimentar, inicialmente o agente etiológico deve estar no homem, em alimentos ou no meio ambiente. Sendo assim, se não estiver presente no alimento, o microrganismo, principalmente as bactérias, devem contaminá-lo antes, durante ou após o processamento. Essa contaminação pode se dar por meio de alimentos crus, higiene dos manipuladores, local de fabricação ou pelo ar. Uma vez no alimento, os microorganismos multiplicam-se até produzirem toxina suficiente para ocasionar a doença (Bryan, 1980).

Os óleos essenciais de várias espécies de plantas podem atuar como agentes naturais na preservação de alimentos e serem acrescentados durante o seu processamento, inibindo o crescimento de bactérias e fungos.

### **2.6.1. *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, 2002).

Atualmente, cerca de 33 espécies de *Staphylococcus* são reconhecidas e divididas em duas categorias: coagulases positivos e coagulases negativos, baseadas na capacidade de coagulação do plasma, importante marcador de patogenicidade dos estafilococos.

Entre essas espécies, o *Staphylococcus aureus* é o maior causador de toxiose alimentar em humanos, pois produz compostos extracelulares, como as enterotoxinas estafilocócicas, coagulases, nucleases e lipases. As enterotoxinas são responsáveis pelas toxioses e, em particular, na área de vigilância sanitária de alimentos, são o maior causador de surtos de toxinfecção durante as diferentes etapas de processamento dos alimentos (Santos A., 2004).

O *Staphylococcus aureus* é a mais resistente de todas as bactérias patogênicas não-formadoras de esporos. É um organismo coagulase positivo, oxidase negativo e aeróbio facultativo. A temperatura de multiplicação está entre 7 e 48°C, sendo 37°C a temperatura ótima para o seu desenvolvimento. Suas enterotoxinas são produzidas quando cultivadas a temperaturas entre 10°- 48°C; contudo, a faixa de 40°-45°C é considerada a ótima para sua produção.

Apresenta distribuição mundial, estimando-se que 20 a 60% da população humana possa ser portador da bactéria, o que aumenta o risco de contaminação por alimentos manipulados. Sua presença em alimentos *in natura*, produtos alimentícios processados, representa risco potencial para saúde, pois algumas cepas produzem enterotoxinas termoestáveis, assim, mesmo que o microrganismo seja eliminado, a toxina produzida continua no alimento.

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

### **2.6.2. *Escherichia coli***

A *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 de infecções urinárias e produtora de enterotoxinas, que podem causar graves doenças de origem alimentar (Tortora, 2002).

Pertence à família *Enterobacteriaceae*, pode ser móvel, dotada de flagelos peritríquicos ou imóveis. É um gênero com grande número de linhagens e pode ser encarado como possuidor de uma única espécie; na qual existem várias centenas de diferentes tipos antigênicos (Holt et al., 1994).

Os tipos são caracterizados por diversas combinações de antígenos O (antígenos lipopolissacarídeos somáticos), K (antígenos polissacarídicos capsulares) e H (antígenos proteícos flagelados), dando origem a vários sorotipos (Sussman, 1997).

A classificação sorológica das *Escherichia coli* isoladas é útil em epidemiologia. Determinados sorotipos estão relacionados com a virulência, mas essa depende da presença de plasmídeos com genes para produção de exotoxinas ou outros fatores de patogenicidade (Maia, 2003).

Os isolamentos bacteriológicos de *E. coli* podem ser convenientemente agrupados em três categorias: amostras oportunistas, enteropatogênicas e enteroxigênicas. Os colibacilos patogênicos oportunistas são, em geral, inócuos em seu habitat natural até que alcancem outros tecidos, podendo causar doenças como, além das já citadas, enterites, meningites, infecções pulmonares, abscessos e infecções da pele e ferimentos (Maia, 2003).

Possuem um papel nutricional importante, sintetizando vitaminas, especialmente a vitamina K. A *Escherichia coli* geralmente permanece confinada ao lúmen intestinal sem causar nenhum dano; entretanto, em organismos imunossuprimidos ou debilitados, ou quando a barreira gastrointestinal é violada, até mesmo as linhagens não patogênicas de *E. coli* podem causar infecção (Corrêa, 2000).

### **2.6.3. *Penicillium commune***

*Penicillium commune* é uma espécie de fungo pertencente ao gênero *Penicillium*, que é adaptado ao crescimento em queijos, incluindo queijos embalados a vácuo (Lund, 1995).

É um importante fungo deteriorador de alimentos, caracterizado por crescimento vagaroso e produção de conídios verdes ou azuis nascidos em penicilos. Produz colônias turquesa-acinzentadas a verde-escuras em CYA, com conidiogênese moderada. Os conidióforos são produzidos isolados ou em fascículos, a maioria a partir de hifas superficiais, sustentando penicilos

terminais triverticiliados. Os conídios são esféricos, de parede lisa, com diâmetro de 3,5-4,0  $\mu\text{m}$ , nascidos em cadeias desordenadas (Taniwaki, 2001).

Por suportar ambientes a vácuo, sugere-se que esses microrganismos possuem habilidade para crescer em atmosferas com baixa concentração de  $\text{O}_2$ , alta concentração de  $\text{CO}_2$  ou ambos. Produz várias micotoxinas, incluindo ácido ciclopiazônico, ácido ciclopaldico e rugulovasinas (Lund, 1995).

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Material vegetal

O material vegetal fresco (370g de *Cymbopogon citratus*) foi coletado no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em outubro de 2005 às 8 horas, com temperatura em torno de 20°C e ausência de chuvas. Para o plantio, utilizou-se adubo orgânico proveniente de compostagem e durante o desenvolvimento da planta, apenas água foi fornecida. Foram coletadas as folhas jovens do capim-limão. Os outros materiais vegetais (367g de *Origanum vulgare* e 512g de *Syzygium aromaticum*) foram adquiridos no comércio da cidade de Lavras no mesmo dia da coleta do material fresco.

### 3.2 Óleos essenciais

#### 3.2.1 Extração

A extração dos óleos essenciais dos vegetais foi realizada no Laboratório de Química Orgânica de Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras (UFLA) – Lavras – MG, por meio do método de arraste a vapor, utilizando-se o aparelho de Clevenger modificado. O material fresco de *Cymbopogon citratus* foi picado em quadrados pequenos para aumentar a superfície de contato e obter maior quantidade de óleo essencial (Castro, 2004). As folhas do orégano e os botões florais do cravo-da-índia já estavam secos e foram utilizados dessa forma.

O material foi acondicionado em balões de 6 litros e o óleo extraído por 3 horas, em temperatura constante, mantendo a ebulição da solução. Decorrido esse tempo, coletou-se o hidrolato, que foi centrifugado em centrífuga de cruzeta horizontal por 5 minutos. O rendimento do óleo foi calculado e expresso em

volume de óleo por peso de folhas frescas (%v/p) e com base na matéria seca ou Base Livre de Umidade (%v/p BLU) (Pimentel et al., 2006).

### **3.2.2 Identificação e quantificação dos constituintes dos óleos essenciais**

As análises qualitativas dos óleos foram realizadas no Laboratório de Análises e Sínteses de Agroquímicos do Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa (UFV) – Viçosa – MG por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/EM), utilizando-se aparelho Shimadzu CG-17<sup>a</sup>, com detector seletivo de massa modelo QP 5000 sob as seguintes condições operacionais: coluna capilar de sílica fundida (30 m X 0,25 mm) com fase ligada DB5 (0,25 µm de espessura de filme); temperatura do injetor de 220°C; programação da coluna com temperatura inicial de 40°C, sendo acrescidos 3°C a cada minuto até atingir 240°C; gás carreador hélio (1mL min<sup>-1</sup>); taxa de split 1:10; volume injetado de 1 µL (1% de solução em diclorometano) e pressão inicial na coluna de 100,2 KPa. As condições de EM foram: energia de impacto de 70 eV; velocidade de decomposição 1000; intervalo de decomposição de 0,50; e fragmentos de 45 Da e 450 Da decompostos. Injetou-se, nas mesmas condições das amostras, uma serie de padrões de hidrocarbonetos (C<sub>9</sub>H<sub>20</sub> ..... C<sub>26</sub>H<sub>54</sub>). Os espectros obtidos foram comparados com o banco de dados da biblioteca Wiley 229 e pelo índice de Kovat`s, calculado para cada constituinte de acordo com Adams (1995).

As análises quantitativas foram conduzidas no Laboratório de Química Orgânica do Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras (UFLA) – Lavras – MG, utilizando cromatógrafo gasoso Shimadzu GC 17A equipado com detector por ionização de chamas (FID), nas condições operacionais: coluna capilar DB5; temperatura do injetor de 220°C; temperatura de detector FID de 240°C; programação da coluna com temperatura inicial de 40°C até 240°C; gás carreador nitrogênio (2,2 mL min<sup>-1</sup>); taxa de split 1:10 e

volume injetado de 1 µL (1% de solução em diclorometano) e pressão na coluna de 115 KPa. A quantificação de cada constituinte foi obtida por meio de normalização de áreas (%).

### **3.3 Atividade Biológica dos Óleos Essenciais**

As análises microbiológicas dos óleos essenciais foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos de Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras (UFLA) - Lavras - MG.

#### **3.3.1 Efeito inibitório de óleos essenciais sobre *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.**

Para a avaliação “*in vitro*” do efeito inibitório dos óleos de *Cymbopogon citratus* (capim-limão), *Origanum vulgare* (orégano) e *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia), foram utilizadas as cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 8739. Durante o experimento, os microrganismos foram mantidos em slants de TSA (triptc Soy Agar Merk) em refrigeração (4°C), repicados em caldo TSB para a ativação das culturas e a realização dos ensaios. As culturas ativadas foram repicadas para caldo infusão de cérebro e coração (BHI Oxoid), ficando incubadas a 37°C por 24 horas. Após esse período, uma alíquota de 5 mL foi transferida para o meio de cultura Mueller Hinton, cuja metodologia empregada foi a difusão em ágar. A concentração de cada óleo foi determinada em relação ao diâmetro do halo de inibição obtido. Os slots ou poços de deposição dos óleos essenciais foram feitos no ágar com o auxílio de pérolas de vidro, retiradas previamente. Em seguida, 8 µL dos óleos essenciais foram diluídos em etanol e transferidos para os mesmos.

O ágar Miller Hinton foi inoculado com as culturas reveladoras (*Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*) e depositados sobre camada do mesmo ágar em que foram feitos os slots, que foram preenchidos com os óleos

nas concentrações de 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 20; 30; 40 e 50%, e para a análise do sinergismo (combinação entre os óleos), foram utilizadas as concentrações 0,1; 1; 10; 30 e 50%. As placas foram incubadas em BOD 37°C por 48 horas (Ogunwande et al, 2005) e medidos os diâmetros dos halos formados.

### **3.3.2 Efeito inibitório de óleos essenciais sobre *Penicillium commune***

A cultura do fungo *Penicillium commune* foi obtida na câmara de maturação de queijos de uma indústria alimentícia da cidade de Lavras – MG. Para obtenção do CYA, indicado para a manutenção de culturas e identificação de espécies de *Penicillium*, foi utilizado o meio de cultura CZAPEK-DOX, acrescentado de Extrato de Levedura (Taniwaki, 2001).

O método realizado foi o bioanalítico “*in vitro*”, por meio do qual avaliaram-se os efeitos fungicidas dos óleos essenciais de cravo-da-índia e orégano nas concentrações 100, 250, 500, 1000 e 2000 mg/L e o sinergismo entre eles na concentração de 250 mg/L. Observaram-se o crescimento e/ou inibição micelial da cultura fungica, por meio de comparação com placa-padrão (sem óleo).

Em uma capela asséptica de fluxo laminar, foram adicionados ao meio de cultura previamente autoclavado, à temperatura de 121°C por 15 minutos, os óleos essenciais diluídos em DMSO (Bisht et al, 2006).

As placas de Petri foram previamente marcadas e esterilizadas, estabelecendo um padrão de 10 mL do meio para cada uma. O meio de cultura foi vertido e, em seguida, no centro dessas placas, foi inoculado o microrganismo. As placas foram vedadas com filme plástico e incubadas em BOD à temperatura de 25°C durante 10 dias.

As avaliações foram realizadas após 5 e 10 dias da montagem do experimento, por meio de medições diametralmente opostas do crescimento micelial e, de cada duas medidas opostas, foram calculadas as médias.

### 3.3.3 Análise estatística

Para a análise estatística, utilizou-se o delineamento em blocos casualizados tendo, o fator bactérias como blocos (*Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*), em que o esquema fatorial foi de 3 x 9 x 2, sendo três óleos essenciais (cravo da índia, orégano e capim-limão), nove concentrações (0,1, 0,5, 1, 5, 10, 20, 30, 40 e 50%), totalizando 27 tratamentos com duas repetições. Para estudo do efeito inibitório do fungo (*Penicillium. commune*), foi utilizado um delineamento com 2 x 6 x 3, sendo dois óleos (cravo-da-índia e orégano) e seis concentrações (0, 100, 250, 500, 1000 e 200 mg/L), totalizando 12 tratamentos com três repetições.

Para estudo do efeito sinérgico dos óleos essenciais, foi realizado o delineamento em blocos casualizados, sendo o fator bactérias como blocos (*Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*), em que o esquema fatorial foi de 3 x 5 x 2, sendo três combinações dos óleos essenciais (capim-limão/orégano, orégano/cravo-da-índia, cravo-da-índia/capim-limão), cinco concentrações (0,1, 1, 10, 30 e 50%), totalizando 15 tratamentos com duas repetições. Para estudo do efeito sinérgico dos óleos essenciais sobre o fungo (*Penicillium. commune*), foi utilizada a combinação dos óleos orégano/cravo-da-índia em um delineamento com 5 x 3, sendo 5 proporções dos óleos (0/0, 50/50, 60/40, 70/30, 80/20) e três repetições.

O programa estatístico utilizado foi o SISVAR (Ferreira D., 2000). Quanto à análise de variância, os tratamentos foram submetidos ao teste de Scott-Knott a 5% de significância.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Óleos Essenciais

#### 4.1.1 Rendimento

Os teores de óleo essencial das espécies estudadas foram comparados com aqueles encontrados na literatura. Pelos dados descritos na Tabela 1, pode-se verificar que os rendimentos obtidos mostraram-se variáveis em Base Livre de Umidade (BLU).

TABELA 1 - Rendimentos dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus*, *Origanum vulgare* e *Syzygium aromaticum* em Base Livre de Umidade (BLU)

Amostra	Massa (g)	Teor (%)	Umidade (%)
<i>Cymbopogon citratus</i> (Folhas frescas)	370,0	2,16	70
<i>Origanum vulgare</i> (Folhas secas)	366,68	1,47	6
<i>Syzygium aromaticum</i> (Botões florais secos)	512,46	2,32	5

Silva et al (2004) encontraram um rendimento de 1,06% para os óleos das folhas secas de *Cymbopogon citratus*; Sahin et al (2004) observaram teor de 2,31% nas folhas secas de *Origanum vulgare* e Santos (2005) obteve rendimento de 1,1% em botões florais secos de *Syzygium aromaticum*.

Analisando os dados apresentados na Tabela 1, observa-se que os teores do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e *Syzygium aromaticum* foram maiores que aqueles observados pelos pesquisadores, ao passo que o óleo essencial de *Origanum vulgare* mostrou menor rendimento.

Segundo 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. Justificam-se esses resultados pelo fato de que, no dia anterior à coleta das folhas do *Cymbopogon citratus*, o tempo estava chuvoso. Em relação às amostras de *Origanum vulgare* e *Syzygium aromaticum*, essas foram adquiridas no comércio, não conhecendo, portanto, suas condições de coleta.

#### **4.1.2 Identificação e quantificação dos constituintes dos óleos essenciais**

##### **4.1.2.1 *Cymbopogon citratus***

Os principais constituintes do óleo essencial do *Cymbopogon citratus* (capim-limão) encontrados por meio de cromatografia gasosa acoplada ao espectômetro de massa foram neral, geranial, que isomericamente formam o citral, mirceno, neo-mentol, acetato de linalila, (Z)- $\beta$ -ocimeno e (E)- $\beta$ -ocimeno, nas proporções observadas na Tabela 2.

Craveiro et al (1981) avaliando a composição química do óleo essencial dessa planta, identificaram que os compostos citral (mistura isomérica de neral e citral) são majoritários e responsáveis pelo aroma cítrico da planta.

Sacchetti et al. (2005) comprovaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, pela análise de seus constituintes químicos por CG/MS. Encontraram, 0,43% de methyl-5-epten-2-one, 15,48% de mirceno, 1,28% de linalol, 32,3% de neral, 3,35% de geraniol e 41,3% de geranial. Esses resultados foram similares aos encontrados para a planta estudada. Algumas variações justificam-se pelos motivos já citados acima, diferenças na época de plantio, tipo de solo e clima, entre outros.

TABELA 2 - Constituintes químicos do óleo essencial de capim-limão identificados pelo CG/EM – Índice de Kovat's.

Índice de Kovat's (min.)	Constituintes	Abundância (%)
13.3	mirreno	19,7
25.8	geranial	31,8
27.3	neral	40,2
18.5	neo-mentol	1,1
28.1	acetato de linalila	0,4
21.7	(Z)- $\beta$ -ocimeno	1,1
22.7	(E)- $\beta$ -ocimeno	1,4

#### 4.1.2.2 *Syzygium aromaticum*

A avaliação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* apresentou em sua constituição eugenol, trans-cariofileno,  $\alpha$ -humuleno, acetato de eugenila e  $\alpha$ -humuleno, conforme proporções indicadas na Tabela 3.

Oussalah et al. (2006) avaliaram os constituintes do óleo essencial de cravo-da-índia e encontraram as seguintes proporções: 78% de eugenol e 8% de acetato de eugenila, confirmando o resultado encontrado para o óleo de cravo-da-índia testado nas bactérias e fungo estudados.

Infere-se, portanto, que o eugenol, sendo o constituinte majoritário, pode ser o responsável pelo efeito fungicida e bactericida do óleo essencial de cravo-da-índia, sendo muito utilizado como antisséptico.

TABELA 3 - Constituintes químicos do óleo essencial de cravo-da-índia identificados pelo CG/EM – Índice de Kovat's.

Índice de Kovat's (min.)	Constituintes	Abundância (%)
31.5	eugenol	86,3
34.1	trans-cariofileno	8,2
35.5	$\alpha$ -humuleno	0,8
38.6	acetato de eugenila	3,6

#### 4.1.2.3 *Origanum vulgare*

Pelos dados obtidos na Tabela 4, pode-se observar as proporções dos constituintes do óleo essencial do *Origanum vulgare* utilizado. As substâncias encontradas no banco de dados foram  $\alpha$ -pineno,  $\alpha$ -felandreno, mirceno,  $\alpha$ -terpineno, p-cimeno,  $\beta$ -felandreno,  $\beta$ -cimeno,  $\gamma$ -terpineno, terpinoleno, linalol, terpen-4-ol,  $\alpha$ -terpineol, timol metil ether, carvacrol metil éter, acetato de linalila, carvacrol e trans-cariofileno.

Milos et al. (2000), pesquisando os constituintes do óleo essencial do orégano, identificaram um total de 16 compostos. Entre eles, pode-se listar 40,4% de timol, 24,8% de carvacrol e 16,8% de p-cimeno, 1,7% de  $\gamma$ -terpineno, 2,1% de 1-octen-3-ol e 2,1% de borneol, confirmando alguns dos compostos identificados em menor quantidade no óleo essencial de *Origanum vulgare* utilizado.

TABELA 4 - Constituintes químicos do óleo essencial de orégano identificados pelo CG/EM – Índice de Kovat's.

Índice de Kovat's (min.)	Constituintes	Abundância (%)
10.1	$\alpha$ -pineno	0,7
12.3	$\alpha$ -felandreno	1,1
13.2	mirceno	2,7
14.4	$\alpha$ -terpineno	6,9
14.8	p-cimeno	4,6
14.9	$\beta$ -felandreno	2,3
15.5	$\beta$ -cimeno	16,6
16.6	$\gamma$ -terpineno	16,0
18.0	terpinoleno	1,8
18.6	linalol	12,3
22.6	terpen-4-ol	26,3
23.2	$\alpha$ -terpineol	3,8
25.3	timol metil ether	0,8
25.8	carvacrol metil eter	1,6
26.4	acetato de linalila	1,7
28.2	carvacrol	7,2
34.1	trans-cariofileno	1,3

## **4.2 Atividade biológica**

### **4.2.1 Efeito inibitório de óleos essenciais sobre *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.**

Os halos de inibição das bactérias *Escherichia coli* ATCC 8739 e *Staphylococcus aureus* ATCC 8739 induzidos pelos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* (capim-limão), *Origanum vulgare* (orégano) e *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia) foram medidos e revelaram efeito inibitório para os referidos óleos.

Pelos dados da Tabela 5, observa-se que o efeito do óleo essencial de capim-limão sobre *Escherichia coli* não apresentou variação significativa no tamanho do halo nas concentrações de 0,1, 0,5, 1, 5 e 10%, enquanto nas concentrações de 20, 30, 40 e 50%, observou-se uma variação de tamanho em relação aos resultados do primeiro grupo; porém, entre eles, os valores mantiveram-se constantes. A placa-controle, constando apenas do solvente etanol, não promoveu formação do halo.

O óleo essencial de orégano não promoveu inibição do crescimento bacteriano na concentração de 0,1%, provavelmente pela baixa concentração. Os outros valores (0,5, 1, 5, 10, 20, 30, 40 e 50%) não apresentaram significativa variação na indução de formação de halo, mas promoveram a formação de halo da bactéria.

O óleo de cravo-da-índia apresentou os melhores resultados de inibição do crescimento entre os óleos; porém, não apresentou variação significativa entre as concentrações 0,1, 0,5, 1 e 5%, que diferiram das concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50%.

TABELA 5 - Resultados médios do efeito inibitório de óleos essenciais sobre *Escherichia coli* submetida a diferentes concentrações.

Bactérias	Concentração (%)	Formação do halo de inibição (cm)		
		Capim-limão	Orégano	Cravo-da-índia
<i>Escherichia coli</i>	0,1	0,7 b	0,0 b	0,8 b
	0,5	0,7 b	0,6 a	0,9 b
	1	0,8 b	0,8 a	0,9 b
	5	0,8 b	0,8 a	1,0 b
	10	0,8 b	0,9 a	1,1 a
	20	1,1 a	0,9 a	1,2 a
	30	1,2 a	0,9 a	1,2 a
	40	1,2 a	0,9 a	1,2 a
	50	1,2 a	0,9 a	1,2 a

Médias seguidas com a mesma letra minúscula não diferem significativamente entre si a 1% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott (1974).

Pelos dados da Tabela 6, observa-se que a avaliação do halo de inibição do *Staphylococcus aureus* apresenta resultado similar ao encontrado para *Escherichia coli*. Em relação ao efeito bactericida do óleo essencial de capim-limão sobre *Staphylococcus aureus*, as concentrações entre 0,1% e 20% não apresentaram significativa variação e houve constância para os outros valores (30%, 40% e 50%). Os óleos de orégano e cravo-da-índia promoveram formação de halo de inibição em todas as concentrações.

TABELA 6 - Resultados médios do efeito inibitório de óleos essenciais sobre *Staphylococcus aureus* submetida a diferentes concentrações.

Bactérias	Concentração (%)	Formação do halo de inibição (cm)		
		Capim-limão	Orégano	Cravo-da-índia
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,1	0,6 b	0,8 b	1,0 c
	0,5	0,6 b	0,9 b	1,1 c
	1	0,6 b	1,0 b	1,1 c
	5	0,7 b	1,0 b	1,1 c
	10	0,8 b	1,0 b	1,1 c
	20	0,8 b	1,0 b	1,1 c
	30	0,9 a	1,0 b	1,1 c
	40	1,0 a	1,2 a	1,3 b
	50	1,1a	1,3 a	1,5 a

Médias seguidas com a mesma letra minúscula não diferem significativamente entre si a 1% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott (1974).

Pelos dados descritos nas tabelas 5 e 6, infere-se o efeito inibitório dos óleos de capim-limão, orégano e cravo-da-índia. Segundo Cox et al. (2000) , a constância entre os resultados observados provavelmente ocorre devido à influência do etanol utilizado na diluição dos óleos; esse solvente pode alterar a entrada do óleo na célula bacteriana, facilitando sua difusão em maiores diluições, porém pouco se conhece a respeito da ação do óleo sobre a estrutura celular bacteriana. Outro fato que pode explicar esse resultado é a utilização do método para determinação de antibiogramas, não sendo, portanto, específico para efeito inibitório de óleos essenciais, o que pode influenciar sua difusibilidade.

Burt (2004) trabalhou com o óleo essencial de orégano e observou que os princípios ativos (timol e o carvacrol) provocam distorção na estrutura física da célula, causando expansão e conseqüente desestabilidade na membrana, modificando sua permeabilidade, desnaturando enzimas essenciais e alterando a força próton motora por meio de variações no pH e potencial elétrico.

Sacchetti et al (2005) verificaram que o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* promoveu notável inibição no crescimento das leveduras *Candida albicans* ATCC 48274, *Rhodotorula glutinis* ATCC 16740, *Schizosaccharomyces pombe* ATCC 60232, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 2365 e *Yarrowia lypolítica* ATCC 16617. O autor atribuiu essa atividade à presença do componente majoritário, o citral, uma mistura isomérica de neral e citral.

Os melhores resultados de inibição, tanto para *Escherichia coli* quanto para *Staphylococcus aureus*, foram atribuídos ao cravo-da-índia. Craveiro (1981) constatou excelentes resultados para *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* utilizando óleo essencial de cravo-da-índia. Atribuiu suas excelentes propriedades bactericidas ao eugenol, componente majoritário encontrado em 80-90% no óleo essencial desta planta. Segundo ele, o eugenol provoca inibição na produção de amilase e proteases pela célula, bem como sua deterioração e lise, esse princípio ativo é muito usado na odontologia como componente de seladores e outros produtos antissépticos. Atualmente, o eugenol tem sido largamente estudado como conservante de alimentos.

As Figuras 8 e 9 mostraram, por diferentes equações de regressão, a progressão da formação do halo de inibição das bactérias submetidas aos diferentes tratamentos.

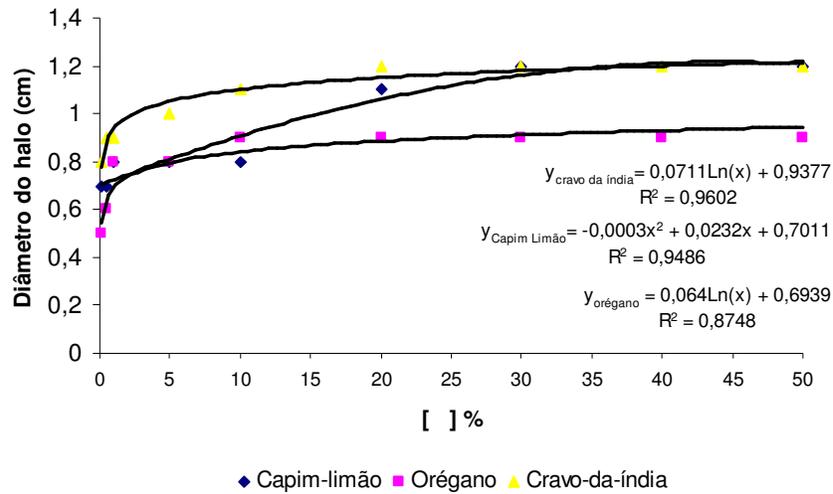


FIGURA 8 - Tamanho dos halos de inibição de *Staphylococcus aureus* provocados pelos óleos essenciais.

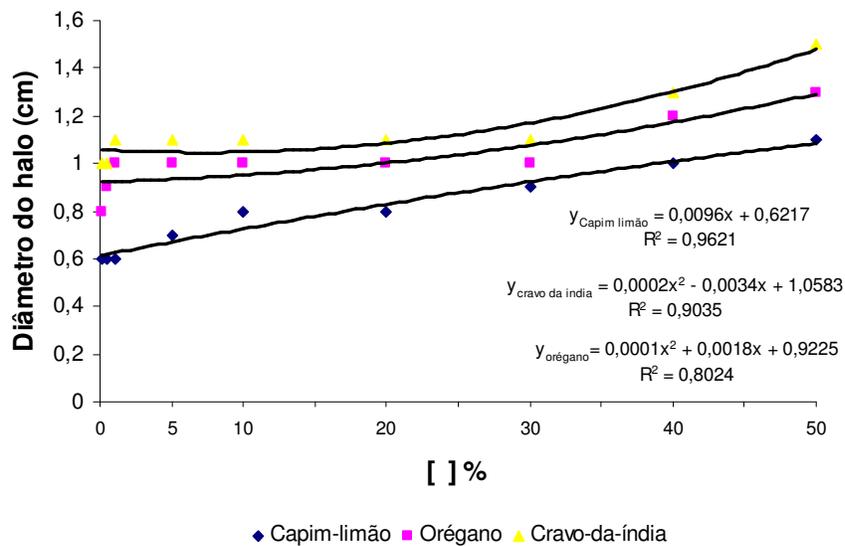


FIGURA 9 - Tamanho dos halos de inibição de *Escherichia coli* provocados pelos óleos essenciais.

A concepção de sinergismo tem sido o tema central de muitas discussões em fitoquímica. A interação entre óleos essenciais pode representar uma alternativa para potencialidade da ação dos mesmos, porém, muito ainda precisa ser esclarecido. Harris et al (2002) examinaram a combinação efetiva entre óleos de Melaleuca (*Melaleuca alternifolia* e *Melaleuca quinquenervia*) e a fração polar de Manuka (*Leptospermum scoparium*). Observou-se um efeito bactericida superior àquele observado nos óleos estudados individualmente.

Tassou et al. (1995) verificaram a ocorrência de sinergismo entre eugenol e NaCl a 5% no alimento; pode-se inferir que, por meio da adição de 2% a 3% de NaCl mais 5% de pó de cravo-da-índia, ocorreu aumento na permeabilidade celular, causando entrada de NaCl no interior da célula e redução do número microbiano.

Os dados do efeito sinérgico entre os óleos de capim-limão, orégano e cravo-da-índia estão representados na Tabela 7. Observa-se que não houve significativa variação entre a combinação e o comportamento individual dos óleos, constatando-se que não ocorreu sinergismo entre eles, na proporção estudada.

#### **4.2.2 Efeito inibitório de óleos essenciais sobre *Penicillium commune***

*Penicillium commune* é uma espécie do fungo *Penicillium*, muito encontrada em queijos, provocando deterioração e liberação de micotoxinas, como o ácido ciclopiazônico (Lund, 1995).

As propriedades fungicidas dos óleos de *Origanum vulgare* e *Syzygium aromaticum* foram testadas sobre o crescimento e/ou inibição micelial de *Penicillium commune*. Não se utilizou o óleo de *Cymbopogon citratus* pelo fato de não ser uma planta utilizada para fins condimentares e suas características organolépticas não serem propícias para adição em queijo.

TABELA 7 - Resultados médios da avaliação do efeito sinérgico dos óleos estudados sobre a formação de halo de inibição pelas duas espécies de bactérias submetidas a diferentes concentrações.

Bactérias	Concentração de óleo essencial (%)	Formação do halo de inibição (cm)		
		Capim-limão + Orégano	Orégano + Cravo-da-índia	Cravo-da-índia + Capim-limão
<i>Escherichia coli</i>	0,1	0,6 b	0,8 b	0,7 c
	1	0,6 b	0,8 b	0,7 c
	10	0,7 b	0,9 b	0,9 b
	30	0,9 a	0,9 b	1,1 a
	50	0,95 a	0,9 b	1,1 a
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,1	0,7 b	0,7 b	0,8 b
	1	0,7 b	0,7 b	0,8 b
	10	0,8 b	0,8 b	0,9 b
	30	0,9 a	0,8 b	1,1 a
	50	0,9 a	0,9 b	1,2 a

Médias seguidas com a mesma letra minúscula não diferem significativamente entre si a 1% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott (1974).

Verifica-se, pelos dados da Tabela 8, que o *Syzygium aromaticum* apresentou inibição total do crescimento micelial do fungo em praticamente todas as concentrações (250, 500, 1000 e 2000 mg/L); para 100 mg/L observou-se um crescimento médio de 1,2 cm aos 5 dias de avaliação e 2,4 cm aos 10 dias, enquanto o padrão apresentou 3,0 cm para 5 dias e 4,4 cm, para 10 dias.

O óleo essencial de *Origanum vulgare* apresentou inibição total do crescimento para o tratamento de 2000 mg/L, ao passo que, para as concentrações de 1000, 500, 250 e 100 mg/L, foram reveladas diferenças significativas entre os tratamentos, sugerindo o efeito inibitório do óleo em estudo.

O efeito inibitório do óleo do orégano foi menor que o do cravo-da-índia, já que esse age mais acentuadamente, inibindo o crescimento micelial em concentrações menores, confirmando a ação efetiva do cravo-da-índia sobre o orégano.

Na figura 10 pode-se observar a inibição total do óleo essencial de cravo-da-índia sobre *Penicillium commune*, bem como o bioensaio sobre o óleo essencial de orégano.

TABELA 8 - Resultados médios da avaliação dos óleos estudados sobre o crescimento micelial do fungo *Penicillium commune* submetidos a diferentes concentrações.

Avaliação (dias)	Concentração (mg/L)	Crescimento micelial (cm)	
		Cravo-da-índia	Orégano
cinco	-	3,1c	3,1e
	100	1,1b	2,1d
	250	0,0a	1,4c
	500	0,0a	0,9b
	1000	0,0a	0,0a
	2000	0,0a	0,0a
Dez	-	4,4c	4,4f
	100	2,4b	3,7e
	250	0,0a	3,5d
	500	0,0a	2,6c
	1000	0,0a	1,3b
	2000	0,0a	0,0a

Médias seguidas com a mesma letra minúscula não diferem significativamente entre si a 1% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott (1974).

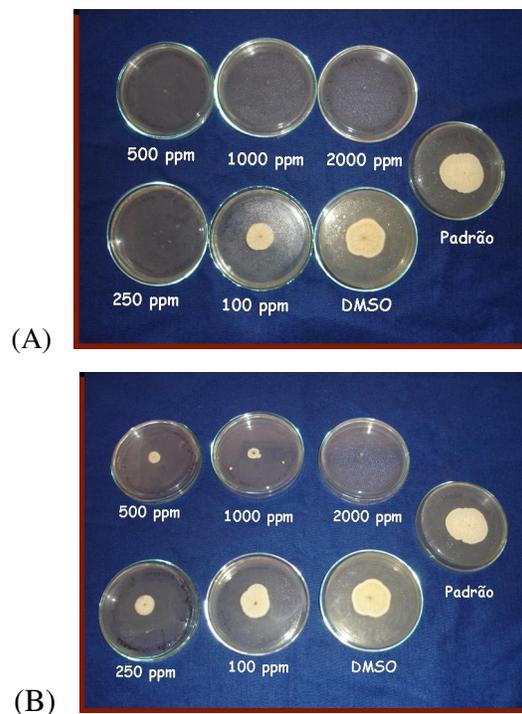


FIGURA 10 - Bioensaios realizados com os óleos essenciais de cravo-da-índia (A) e orégano (B) sobre o crescimento e/ou inibição micelial do fungo *Penicillium commune*.

Segundo Franco (2003), o sabor é uma resposta integrada às sensações do gosto e do aroma. Enquanto o gosto é atribuído aos compostos não-voláteis do alimento, como açúcares, sais e ácidos, o sabor característico é conferido aos alimentos pelos compostos voláteis; dessa forma, para o teste do sinergismo (Figura 11) entre os óleos de cravo-da-índia e orégano, as maiores concentrações são atribuídas ao orégano, pois o seu sabor é mais leve e adequado para acréscimo em queijos. O cravo-da-índia possui sabor muito acentuado e maior efeito inibitório, portanto, foram utilizadas as menores proporções para esse

óleo. Pelos dados da tabela 9, observa-se que não houve efeito sinérgico entre os óleos estudados. Sugere-se que outros estudos sejam realizados com o intuito de analisar outras concentrações entre a combinação dos óleos de orégano e cravo-da-índia.

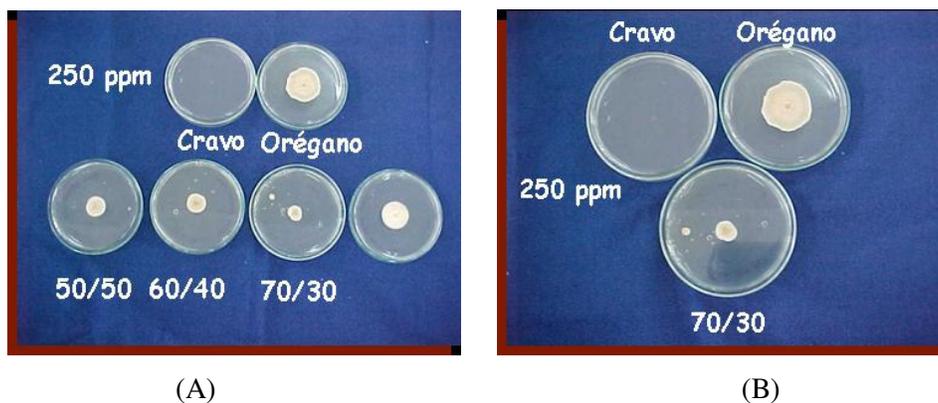


FIGURA 11 - Bioensaios realizados com o sinérgismo entre orégano e cravo-da-índia sobre o crescimento e/ou inibição micelial do fungo *Penicillium commune*. (A) Diferentes proporções e (B) 70% orégano e 30% cravo-da-índia.

TABELA 9 - Resultados médios da avaliação do efeito sinérgico dos óleos estudados sobre o crescimento micelial do fungo *Penicillium commune* submetidos à concentração de 250 mg/L.

Avaliação (dias)	Proporção Orégano x Cravo-da-índia	Crescimento micelial Diâmetro (cm)
cinco	0/0	3,30e
	50/50	0,80b
	60/40	0,86c
	70/30	0,50a
	80/20	1,10d
Dez	0/0	4,50e
	50/50	1,86b
	60/40	2,03b
	70/30	1,56a
	80/20	2,80c

Médias seguidas com a mesma letra minúscula não diferem significativamente entre si a 1% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott (1974).

Analisando os resultados obtidos, observa-se que a utilização de óleos essenciais como inibitórios de fungos e bactérias é boa opção para a substituição de aditivos químicos em alimentos. Todavia, sugerem-se mais estudos a respeito da análise sensorial e aceitação do produto no qual será acrescentado o óleo essencial, pois não adianta eliminar os agentes deterioradores de um alimento se desse tratamento resultar produto com sabor, aroma e cor alterados, bem como mudanças em detrimento de suas propriedades nutritivas.

## 5 CONCLUSÕES

Os óleos essenciais de *Cymbopogon citratus*, *Origanum vulgare* e *Syzygium aromaticum* apresentaram efeito inibitório sobre as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

O efeito inibitório dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* e *Syzygium aromaticum* foi efetivo sobre o fungo *Penicillium commune*. Não houve efeito sinérgico entre os óleos estudados.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectroscopy**. Carol Stream: Allured, 1995. 469 p.

BISHT, G. S.; AWASTHI, A. K.; DHOLE, T. N. Antimicrobial activity of *Hedychium spicatum*. **Fitoterapia**, Amsterdam, v. 77, n. 3, p. 240-242, Apr. 2006.

BRYAN, F. L. **Foodborn diseases and their control**. August, 1980. 86 p.

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.; SHAN, A. Y. K. V.; PINTO, J. E. B. P.; DELÚ-FILHO, N.; BERTOLUCCI, S. K. V. **Metabólitos secundários vegetais: visão geral, química e medicinal**. Lavras: UFLA, 2001. 81 p. (Textos acadêmicos).

CARDOSO, M. G.; SHAN, A. Y. K. V.; SOUZA, J. A. **Fitoquímica e química de produtos naturais**. Lavras: UFLA, 2001. 67 p. (Textos acadêmicos).

CASTRO, D. P. **Atividade inseticida dos óleos essenciais de *Achilea millefolium* e *Thymus vulgaris* sobre *Spodoptera frugiperda* e *Schizaphis graminum***. 2004. 73 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CASTRO, H. G. de; FERREIRA, F. A.; SILVA, D. J. H.; MOSQUIM, P. R. **Metabólitos secundários – contribuição ao estudo das plantas medicinais**. 2. ed. Visconde do Rio Branco: SUPREMA, 2004. 113 p.

CASTRO, L. O.; CHEMALE, V. M. **Plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. Guaíba: Agropecuária, 1995. 196 p.

CASTRO, N. E. A. **Caracterização e fitoquímica de óleos essenciais de eucalipto e seu efeito sobre o protozoário tripanosomatídeo *Herpetomonas samuelpessoai***. 2006. 82 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CORRÊA, M. G. P. **Análise microbiológica, sorológica e molecular de linhagens de *Escherichia coli* isoladas do leite obtido de vacas com mastite.** 2000. 93 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias e Veterinárias). Faculdades de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal.

COX, S. D.; MANN, C. M.; MARKHAM, J. L.; BELL, H. C.; GUSTAFSON, J. E.; WARMINTON, J. R.; WYLLIE, S. G. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Meleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 88, n. 1, p. 170-175 Jan. 2000.

CRAVEIRO, A. A.; FERNANDES, A. G.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; MACHADO, M. I. L. **Óleos essenciais de plantas do Nordeste.** Fortaleza: edições UFC, 1981. 210 p.

FERREIRA, C. P.; JARROUGE, M. G.; TUNDISI, M.; MARTIN, N. F. **Bioquímica Básica.** 4. ed. São Paulo: C. P. Ferreira, 2000. 413 p.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para o Windows versão 4. 0. In: REUNIAO ANUAL DA REGIAO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Programas e resumos...** São Carlos, SP: UFSCar, 2000. p. 255-258.

FRANCO, M. R. B. **Aroma e sabor de alimentos:** temas atuais. São Paulo: Livraria Varela, 2003. 246 p.

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

GAYOSO, C. W.; LIMA, E. O.; OLIVEIRA, V. T.; PEREIRA, F. O.; SOUZA, E. L.; LIMA, I. O.; NAVARRO, D. F. Sensitivity of fungi isolated from onychomycosis to *Eugenia cariophyllata* essential oil and eugenol. **Fitoterapia**, Amsterdam, v. 76, n. 2, p. 247-249, Mar. 2005.

GUILLÉN, M. D.; MANZANOS, M. J. Study of the composition of the different parts of a Spanish *Thymus vulgaris* L. plant, **Food Chemistry** Oxford, v. 63, n. 3, p. 373-383, 1998.

HARRIS, R. Synergism in the essential oil word. **The International Journal of Aromatherapy**, Amsterdam, v. 12, n. 4, p. 179-186, Oct./Dec. 2002.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, H. A. P.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9. ed. Baltimore, Maryland: Williams & Wilkins, 1994.

IKAN, R. **Natural Products**. 2. ed. San Diego, Califórnia: Academic Press, 1991. 360 p.

KULISIC, T.; RADONIC, A.; KATALINIC, V.; MILOS, M. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. **Food Chemistry**, Oxford, v. 85, n. 4, p. 633-640, May 2004.

LEE, S. T.; UMANO, K.; SHIBAMOTO, T.; LEE, K. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant. **Food Chemistry**, Oxford, v. 91, n. 1, p. 131-137, May 2005.

LUND, F.; FILTENBORG, O.; FRISVAD, J. C. Associated mycoflora of cheese. **Food Microbiology**, London, v. 12, n. 2, p. 173-180, Apr. 1995.

MAIA, S. R. **Uso da *Curcuma longa* L. na redução de *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048) em ricota**. 2003. 63 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MATOS, F. J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. Fortaleza: UFC, 1997. 128 p.

MENDONÇA, A. T. **Efeito dos óleos essenciais de condimentos sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* em ricota cremosa**, 2004. 72 p. Dissertação (Doutorado em Ciência dos alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MILOS, M.; MASTELIC, J.; JERKOVIC, I. Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from orégano (*Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum*). **Food Chemistry**, Oxford, v. 71, n. 1, p. 79-83, Oct. 2000.

NEGRAES, P. **Guia A-Z de plantas: condimentos**. São Paulo: Bei Comunicação, 2003. 267 p.

NOSTRO, A.; BLANCO, A. R.; CANNATELLI, M. A.; ENEA, V.; FLAMINI, G.; MORELLI, I.; ROCCARO, A. S.; ALONZO, V. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 230, n. 2, p. 191-195, Jan. 2004.

OGUNWANDE, I. A.; OLAWORE, N. O.; EKUNDAYO, O.; WALKER, T. M.; SCHIMIDT, J. M.; SETZER, W. N. Studies on the essential oils composition, antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora* L. **The International Journal of Aromatherapy**, Amsterdam, v. 15, n. 3, p. 147-152, Jan. 2005.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* 0157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, 2006.

PIMENTEL, F. A.; CARDOSO, M. G.; SALGADO, A. P. S. P.; AGUIAR, P. M.; SILVA, V. F.; MORAIS, A. R.; NELSON, D. L. A convenient method for the determination of moisture in aromatic plants. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 373-375, mar./abr. 2006.

POSER, G. L.; MENTZ, L. A. Diversidade Biológica e Sistemas de Classificação. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre, RS: Ed. Da UFSC, 2004. 1102 p.

PYUN, M. S. Antifungal effects of the volatile oils from *Allium* plants against *Trichophyton* species and synergism of the oils with ketoconazole. **Phytomedicine**, Jena, v. 13, n. 6, p. 394-400, June 2006.

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

SACCHETTI, G.; MAIETTI, S.; MUZZOLI, M.; SCAGLIANTI, M.; MANFREDINI, S.; RADICE, M.; BRUNI, R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**, Oxford, v. 91, n. 4, p. 621-632, Aug. 2005.

SAHIN, F.; GÜLLÜCE, M.; DAFERERA, D.; SÖKMEN, A.; SÖKMEN, M.; POLISSIOU, M.; AGAR, G.; ÖZER, H. Biological activities of the essential oil and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *Vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. **Food Control**, Oxford, v. 15, n. 7, p. 549-557, Oct. 2004.

SAITO, M. L.; SCRAMIN, S. **Plantas aromáticas e seu uso na agricultura**. Jaguariúna: EMPRABA, 2000. 48 p. Empraba meio ambiente. Documentos, 20.

SALGADO, A. P. S. **Efeito da luz na planta e no óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*)**. 2005. 49 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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, MG.

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, MG.

SANTOS, R. I. Metabolismo Básico e Origem dos Metabólitos Secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre, RS: Ed. Da UFSC, 2004. 1102 p.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento dos medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre, RS: Ed. Da UFSC, 2004. 1102 p.

SHELEF, L. A. Antimicrobial affects of spices. **Journal Food Safety**, Trumbull, v. 6, n. 1, p. 29-44, Feb. 1983.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre, RS: Ed. Da UFSC, 2004. 1102 p.

SILVA, V. F.; CARDOSO, M. G.; GUIMARÃES, L. G. L.; MUNIZ, F. R.; SALGADO, A. P. S. P.; MORETTO, P.; MALUF, W. R.; SILVA, V. A.; ANDRADE, M. L. Rendimento de óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D. C.) Stapf.) submetidos a diferentes métodos de cortes e secagens. **Revista Magistra**, Cruz das Almas, v. 17, n. 3, p. 107-153, set./dez. 2005.

SILVA JUNIOR, A. A.; VERONA, M. L. F. **Plantas medicinais e aromáticas**. Itajaí, SC: Ministério de Meio Ambiente, Fundo Nacional do Meio Ambiente, 1997. 456 p.

SUSSMAN, M. **Escherichia coli – Mechanisms of virulence**. New York: Cambridge, 1997. 639 p.

TANIWAKI, M. H.; SILVA, N. **Fungos em alimentos – ocorrência e detecção**. Campinas: Núcleo de Microbiologia/ITAL, 2001. 82 p.

TASSOU, C. C.; KOUTSOUMANIS, K.; NYCHAS, G. J. E. Inhibition of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil. **Food Research International**, Amsterdam, v. 33, n. 3/4, p. 273-280, Apr. 2000.

TASSOU, C. C.; NYCHAS, G. J. E. Antimicrobial Activity of the Essential Oil of Mastic Gum (*Pistacia lentiscus* var. *chia*) on Gram Positive and Gram Negative bacteria in Broth and in Model Food System. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Oxford, v. 36, n. 3/4, p. 411-420, Oct./Dec. 1995.

TESKE, M.; TRENTINI, A. M. M. **Herbarium Compêndio de Fitoterapia**. 3. ed. Curitiba, 1997. 317 p.

TORTORA, G. J. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.

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

VON HERTWIG, I. F. **Plantas aromáticas e medicinais: plantio, colheita, secagem, comercialização**. 2. ed. São Paulo: Ícone, 1991. 414 p.

WILLIAMS, L. R.; STOCKLEY, W. Essential oils with high antimicrobial activity for therapeutic use. **The International Journal of Aromatherapy**, Amsterdam, v. 8, n. 4, Oct./Dec. 1998.

## ANEXOS

ANEXO A		Página
<b>TABELA 1A</b>	Análise de variância do efeito inibitório dos óleos essenciais de capim-limão, orégano e cravo-da-índia sobre a bactéria <i>Escherichia coli</i> .....	53
<b>TABELA 2A</b>	Análise de variância do efeito inibitório dos óleos essenciais de capim-limão, orégano e cravo-da-índia sobre a bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> .....	53
<b>TABELA 3A</b>	Análise de variância do efeito sinérgico entre os óleos essenciais de capim-limão, orégano e cravo-da-índia sobre a bactéria <i>Escherichia coli</i> .....	54
<b>TABELA 4A</b>	Análise de variância do efeito sinérgico entre os óleos essenciais de capim-limão, orégano e cravo-da-índia sobre a bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> .....	54
<b>TABELA 5A</b>	Análise de variância do efeito inibitório dos óleos essenciais de orégano e cravo-da-índia sobre o fungo <i>Penicillium commune</i> .....	55
<b>TABELA 6A</b>	Análise de variância do efeito sinérgico dos óleos essenciais de orégano/cravo-da-índia sobre o crescimento do fungo <i>Penicillium commune</i> .....	55

<b>ANEXO B</b>		<b>Página</b>
<b>FIGURA 1B</b>	Cromatograma do óleo essencial obtido das folhas secas do orégano.....	56
<b>FIGURA 2B</b>	Cromatograma do óleo essencial obtido dos botões florais secos do cravo-da-índia.....	57
<b>FIGURA 3B</b>	Cromatograma do óleo essencial obtido das folhas frescas do capim-limão.....	58

**TABELA 1A** - Análise de variância do efeito inibitório dos óleos essenciais de capim-limão, orégano e cravo-da-índia sobre a bactéria *Escherichia coli*.

capim-limão CV= 11,16				
FV	GL	QM	Fc	Pr > F
Concentrações	8	0.100556	9.050	0.0017
Erro	9	0.011111		

orégano CV= 19,00				
FV	GL	QM	Fc	Pr > F
Concentrações	8	0.175556	8.778	0.0019
Erro	9	0.020000		

cravo-da-índia CV=8,93				
FV	GL	QM	Fc	Pr > F
Grupo genético	8	0.050556	5.688	0.0088
Erro	9	0.008889		

**TABELA 2A** - Análise de variância do efeito inibitório dos óleos essenciais de capim-limão, orégano e cravo-da-índia sobre a bactéria *Staphylococcus aureus*.

capim-limão CV= 10,35				
FV	GL	QM	Fc	Pr > F
Concentrações	8	0.067222	10.083	0.0011
Erro	9	0.006667		

orégano CV= 6,52				
FV	GL	QM	Fc	Pr > F
Concentrações	8	0.043889	9.875	0.0012
Erro	9	0.004444		

cravo-da-índia CV=4,08				
FV	GL	QM	Fc	Pr > F
Grupo genético	8	0.045556	20.500	0.0001
Erro	9	0.002222		

**TABELA 3A** - Análise de variância do efeito sinérgico entre os óleos essenciais de capim-limão, orégano e cravo-da-índia sobre a bactéria *Escherichia coli*.

capim-limão+orégano CV= 12,65				
FV	GL	QM	Fc	Pr > F
Concentrações	4	0.055000	6.111	0.0365
Erro	5	0.009000		

cravo-da-índia+orégano CV= 14,71				
FV	GL	QM	Fc	Pr > F
Concentrações	4	0.006000	0.375	0.8184
Erro	5	0.016000		

cravo-da-índia+Capim-limão CV=0,00				
FV	GL	QM	Fc	Pr > F
Grupo genético	4	0.080000	1.0E+0009	0.0000
Erro	5	0,000000		

**TABELA 4A** - Análise de variância do efeito sinérgico entre os óleos essenciais de capim-limão, orégano e cravo-da-índia sobre a bactéria *Staphylococcus aureus*.

capim-limão+orégano CV= 11,18				
FV	GL	QM	Fc	Pr > F
Concentrações	4	0.020000	2.500	0.1711
Erro	5	0.008000		

cravo-da-índia+orégano CV= 14,04				
FV	GL	QM	Fc	Pr > F
Concentrações	4	0.014000	1.167	0.4246
Erro	5	0.012000		

cravo-da-índia+capim-limão CV=9,32				
FV	GL	QM	Fc	Pr > F
Grupo genético	4	0.066000	8.250	0.0199
Erro	5	0.008000		

**TABELA 5A** - Análise de variância do efeito inibitório dos óleos essenciais de orégano e cravo-da-índia sobre o fungo *Penicillium commune*.

5 dias CV= 1,53				
FV	GL	QM	Fc	Pr > F
Concentrações	3	2.667500	3201.000	0.0000
Erro	8	0.000833		

10 dias CV= 4,29				
FV	GL	QM	Fc	Pr > F
Concentrações	3	1.660833	71.179	0.0000
Erro	8	0.023333		

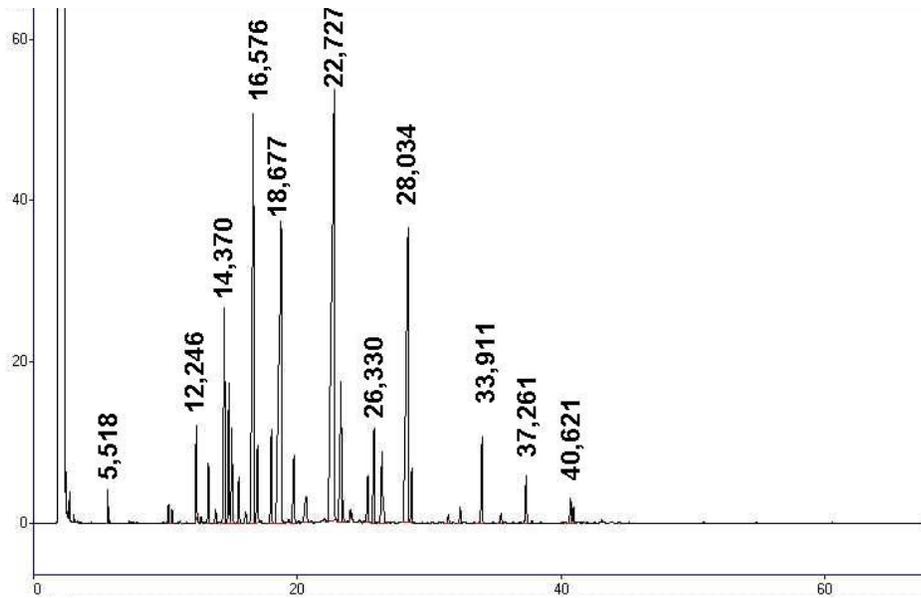
**TABELA 6A** - Análise de variância do efeito sinérgico dos óleo essenciais de orégano/cravo-da-índia sobre o crescimento do fungo *Penicillium commune*

5 dias CV= 1,97				
FV	GL	QM	Fc	Pr > F
Concentrações	4	3.837667	5756.500	0.0000
Erro	10	0.000667		

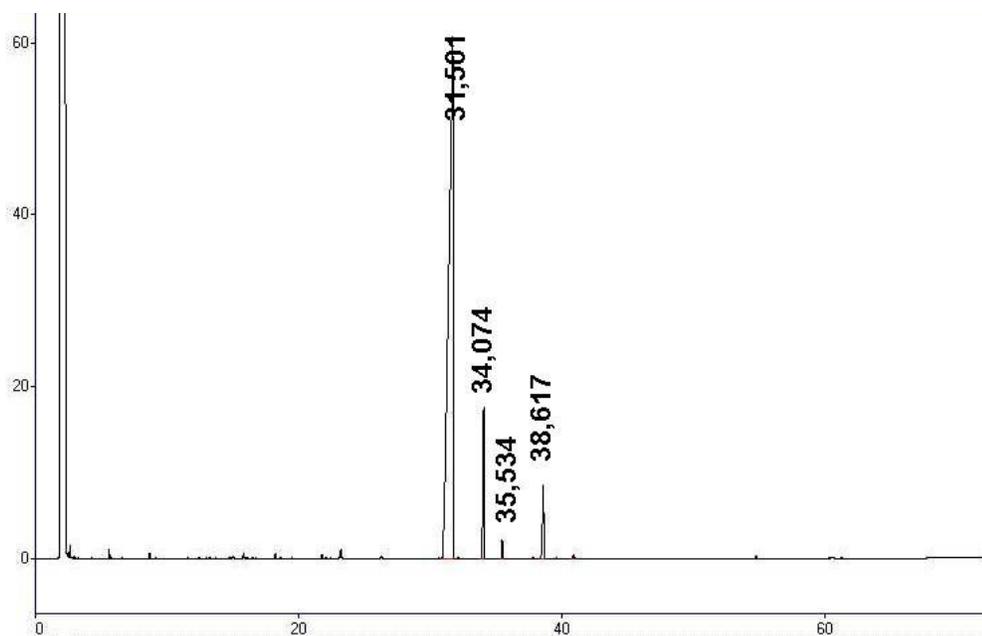
  

10 dias CV= 3,92				
FV	GL	QM	Fc	Pr > F
Concentrações	4	4.174333	417.433	0.0000
Erro	10	0.010000		

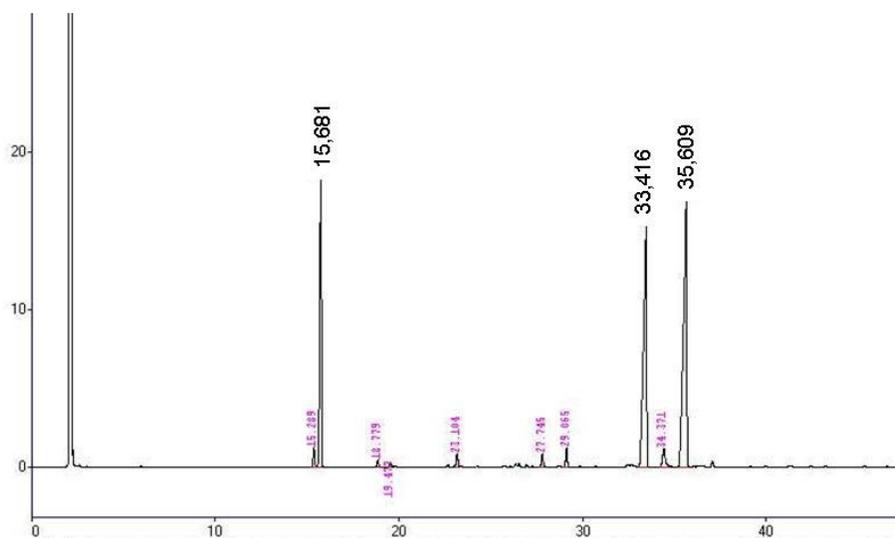
## ANEXO B



**FIGURA 1B** - Cromatograma do óleo essencial obtido das folhas secas do orégano.



**FIGURA 2B** - Cromatograma do óleo essencial obtido dos botões florais secos do cravo-da-índia.



**FIGURA 3B** - Cromatograma do óleo essencial obtido das folhas frescas do capim-limão.